



Amplification ex vivo de lymphocytes T CD8 humains spécifiques à l'aide de molécules recombinantes multimérisées.

Catherine Rabu

► To cite this version:

Catherine Rabu. Amplification ex vivo de lymphocytes T CD8 humains spécifiques à l'aide de molécules recombinantes multimérisées.. Immunologie. Université de Nantes, 2005. Français. <tel-00339416>

HAL Id: tel-00339416

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00339416>

Submitted on 17 Nov 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE PHARMACIE

**Amplification *ex vivo* de lymphocytes T CD8 humains
spécifiques à l'aide de molécules recombinantes
multimérisées.**

Thèse de Doctorat

Ecole Doctorale : Chimie-Biologie

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Catherine RABU

Le 8 novembre 2005, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs : **M. Eric ROBINET**, Chargé de Recherches, Besançon
M. Daniel OLIVE, Professeur des Universités, Marseille

Examineur : **M. Yannick JACQUES**, Directeur de Recherches, Nantes

Directeur de Thèse **M. François LANG**, Professeur des Universités, Nantes

Inserm Unité 601

Je remercie le Dr. Eric Robinet et le Pr. Daniel Olive qui me font l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse.

Je remercie le Dr. Yannick Jacques pour avoir accepté d'être membre de ce jury.

Je remercie le Pr. Francine Jotereau pour m'avoir accueillie dans l'équipe de recherche qu'elle dirige.

Je remercie le Dr. Marc Bonneville pour m'avoir accueillie dans l'unité INSERM U601 qu'il dirige.

Il serait trop long d'énumérer toutes les raisons pour lesquelles je souhaite adresser mes plus chaleureux remerciements à François Lang. Je me contenterai donc de le remercier pour l'énergie, la patience, et l'acharnement qu'il a déployés pour encadrer ce travail. Ces années de formation sous sa direction furent très enrichissantes.

Je remercie tout aussi chaleureusement Nathalie Labarrière pour sa bonne humeur, sa grande disponibilité, ses conseils avisés et son amitié.

Je remercie également les membres de l'équipe 3 avec qui nous avons collaboré : Patricia Vusio qui a réalisé les manips de BiaCore et Agnès Quémener qui a modélisé le 4-1BBL.

Mille mercis à Karine Bernardeau pour tous les moments de complicité que nous avons partagés au cours de ces quelques années passées dans ce labo.

Un grand merci à Pierre-Joseph Royer et Régis Bouquié pour leur aide précieuse apportée dans la finalisation de ce manuscrit.



EN ESSAYANT CONTINUUELLEMENT
ON FINIT PAR RÉUSSIR. DONC:
PLUS ÇA RATE, PLUS ON A
DE CHANCES QUE ÇA MARCHE.

Un grand merci également à Klára Echasserieu et Audrey Lartigue pour leur aide et leurs conseils sur la plateforme de protéines recombinantes.

Merci à Elizabeth Diez pour sa grande disponibilité et son aide en culture cellulaire.

Je remercie toutes les personnes que j'ai eu plaisir à cotoyer à l'U601, et en particulier Delphine Carbonnelle, Marie Bodinier, Blanca Ripolles-Piquer, Frédéric Ebstein, Virginie Vignard, Emmanuelle Godefroy, Annabelle Bonin, Yannick Guilloux, Nadine Gervois, Michel Chérel, François Davodeau, Thomas Simon, Severine Tanguy-Royer, Gregory Bellot, Carole Sapède et Erwan Mortier.

Sommaire

INTRODUCTION	9
I. INDICATIONS DE L'IMMUNOTHERAPIE CELLULAIRE PASSIVE	12
A. Rétablir une immunité anti-virale	12
B. Conférer une immunité anti-tumorale	18
II. CARACTERISATION DES LYMPHOCYTES T CD8	25
A. Reconnaissance antigénique par les lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8	25
1. Les molécules CMH de classe I	25
2. Les peptides antigéniques associés aux molécules de classe I	26
3. Le récepteur des lymphocytes T $\alpha\beta$ (TCR)	26
4. Le co-récepteur CD8	29
5. Complexe CMH-peptide recombinant	30
6. Synapse immunologique	31
7. Transmission du signal d'activation	32
B. Réponses des lymphocytes T CD8	33
1. Initiation de la reconnaissance	33
2. Expansion clonale	34
3. Contraction	37
4. Génération du répertoire mémoire	38
C. Rôle des cytokines dans l'activation T CD8	48
D. Rôle des molécules accessoires dans l'activation T CD8	54
1. Molécules d'adhérence	54
2. Molécules de co-stimulation	57
III. METHODES DE GENERATION DE LYMPHOCYTES T CD8 A USAGE CLINIQUE	68
A. Nature et origine des lymphocytes injectés	68
B. Critères exigés	68
C. Méthodes utilisées	69
1. Méthodes cellulaires	70
2. Méthodes acellulaires	74
D. Projet de recherche et objectifs du travail	76
RESULTATS	78
I. ETUDE DE L'EXPRESSION DU 4-1BB SUR LES LYMPHOCYTES T	79
A. Résultats	79
B. Conclusions et perspectives	88
II. PRODUCTION, PURIFICATION ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET FONCTIONNELLE D'UN 4-1BBL CHIMERIQUE : AVITAG-4-1BBL	90
A. Résumé	90
B. Données complémentaires	109
C. Commentaires	113

III.	MISE AU POINT DES CONDITIONS D'AMPLIFICATION LYMPHOCYTAIRES T SPECIFIQUES A L'AIDE DE HLA-A2/PEPTIDE ET DE 4-1BBL DANS LE CONTEXTE VIRAL	116
A.	<i>Principe de l'amplification</i>	117
B.	<i>Les lymphocytes</i>	117
C.	<i>Les billes</i>	121
D.	<i>Amplification obtenue selon les modèles étudiés</i>	125
1.	Amplification à partir de PBMC	125
2.	Amplification à partir de CD8 purifiés	127
E.	<i>Caractérisation des cellules générées</i>	133
1.	Analyse phénotypique des lymphocytes générés	133
2.	Analyse fonctionnelle des lymphocytes générés	141
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	146
	MATERIEL ET METHODES	158
	BIBLIOGRAPHIE	164

Listes des Figures et des Tableaux

Figures

Figure 1. Structure tri-dimensionnelle des molécules du CMH de classe I.....	26
Figure 2. Représentation schématique des interactions entre le TCR et le CD8 avec le CMH-peptide.....	28
Figure 3. Sélection thymique des lymphocytes T naïfs	29
Figure 4. Production de complexes CMH-peptide recombinants	31
Figure 5. Premiers événements de transduction du signal d'activation par le complexe TCR/CD3	32
Figure 6. Modèle de différenciation selon l'expression des marqueurs CD45RA et CD27.....	40
Figure 7. Modèle de différenciation selon l'expression des marqueurs CD45RA, CCR7 et CD62L....	41
Figure 8. Analyse phénotypique des lymphocytes T selon l'antigène considéré.....	42
Figure 9. Schéma des récepteurs à l'IL7, l'IL2 et l'IL15	49
Figure 10. Evolution de l'expression des récepteurs aux cytokines IL2, IL7 et l'IL15.....	51
Figure 11. Molécules d'adhérence dans l'interaction DC-lymphocyte T.....	55
Figure 12. Principales molécules de co-stimulation intervenant dans l'interaction DC-lymphocytes ..	57
Figure 1. Cinétique d'expression du 4-1BB sur les PBMC.....	80
Figure 2. Expression de 4-1BB sur les T purifiés ou sur les T des PBMC.....	81
Figure 3. Expression du 4-1BB en fonction de la présence ou non des cellules CD14+.....	82
Figure 4. Répartition de l'expression du 4-1BB à la surface des sous-populations T CD4 et CD8.	83
Figure 5. Analyse du rôle de l'IL15 sur l'expression du 4-1BB par les T CD8.....	84
Figure 6. Expression préférentielle du 4-1BB sur les CD28-.....	86
Figure 7. Expression du 4-1BB sur les T CD8+ selon le statut CD28.....	87
Figure 8. Courbe de saturation des billes streptavidine par l'AviTag-4-1BBL.	109
Figure 9. Spécificité de la prolifération T induite par l'AviTag-4-1BBL.	110
Figure 10. Quand ajouter le 4-1BBL?	111
Figure 11. Comparaison de différents type de co-stimulation.....	112
Figure 12. Représentation schématique des différents complexes d'AviTag-4-1BBL.	117
Figure 14. Caractérisation phénotypique des lymphocytes spécifiques à JO.....	119
Figure 15. Expression du 4-1BB par les lymphocytes T spécifiques.	120
Figure 16. Calibration des billes avec le monomère HLA et l'anti-CD28..	122
Figure 17. Calibration des billes HLA/AviTag-4-1BBL.	124
Figure 18. Amplification des lymphocytes T spécifiques à partir de PBMC.....	126
Figure 19. Photo des PBMC co-cultivés avec des billes.....	127
Figure 20. Le signal 4-1BBL peut être délivré indépendamment du signal HLA..	128
Figure 21. Nombre de cellules spécifiques de pp65.....	130
Figure 22. Nombre de cellules spécifiques de BMLF-1..	132
Figure 23. Statut CD28+ et bénéfice de la co-stimulation par de l'anti-CD28	132
Figure 24. Evolution du statut CD28 par la stimulation HLA, HLA/CD28 et HLA/4-1BBL.	135
Figure 25. Analyse phénotypique des lymphocytes spécifiques: marqueur CD62L et CCR7	136
Figure 26. Phénotype CD45RA et RO	138
Figure 27. Analyse phénotypique du marqueur CD27.	140
Figure 28. Capacité cytotoxique des lymphocytes générés.	142
Figure 29. Perforine intra-cytoplasmique..	144
Figure 30. Sécrétion de cytokines IL2 et IFN- γ	145
Figure 1. Amplification T anti-Melan-A/MART-1 à partir des PBMC d'un patient.....	156

Tableaux

Tableau I. Effet de l'IL15 et de l'IL12 sur l'expression du 4-1BB par les lymphocytes T purifiés.	85
Tableau II. Pourcentage des cellules CD8+/CD28+/4-1BB+.....	87
Tableau III. Constantes d'affinité des différents 4-1BBL recombinants pour le 4-1BB.	113
Tableau IV. Fréquence des lymphocytes dirigés contre les épitopes pp65 et BMLF-1.	118
Tableau V. Evolution de la fréquence des cellules spécifiques au cours de la culture.	121
Tableau VI. Nombre de lymphocytes T spécifiques de pp65 à J0 et à J14	130
Tableau VII. Nombre de lymphocytes T spécifiques de BMLF-1 à J0 et à J14	131
Tableau VIII. Evolution du statut CD28 au cours de l'amplification	134
Tableau IX. Pourcentage de lymphocytes spécifiques CCR7-/CD62L+	136
Tableau X. Phénotype CD45RA et CD45RO.....	138
Tableau XI. Phénotype CD27 des lymphocytes T amplifiés.....	139
Tableau XII. Intensité du marquage perforine des cellules spécifiques.	143

Liste des abréviations utilisées

APC : Allophycocyanine

ANOVA : *ANalysis Of VAriance*

CD : *Cluster of Differentiation*

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

DC : *Dendritic Cell*

EBV : *Ebstein Barr Virus*

FACS : *Fluorescence Activated Cell Sorter*

FITC : Fluoresceine Isothiocyanate

GvH (GvHD) : *Graft versus Host Disease*

GvL : *Graft versus Leukemia*

HLA : *Human Leucocyte Antigen*

IL : Interleukine

K_d : Constante d'affinité

K_{off} : Constante de dissociation

K_{on} : Constante d'association

LAK : *Lymphokine Activated Killer*

MFI : *Mean Fluorescence Intensity*

NK : *Natural Killer*

PBL : *Peripheral Blood Lymphocyte*

PBMC : *Peripheral Blood Mononuclear Cell*

PE : Phycoérythrine

TCR : *T Cell Receptor*

TIL : *Tumor Infiltrating Lymphocyte*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

INTRODUCTION

Introduction

Le système immunitaire a pour fonction d'empêcher la prolifération intempestive d'agents étrangers qui pourraient nuire à l'intégrité de l'organisme. La plupart sont détectés et détruits en quelques heures par des mécanismes de l'immunité innée qui ne sont pas spécifiques d'un antigène et qui constituent la première ligne de défense du système immunitaire. Si cette immunité innée ne parvient pas à éliminer totalement le microorganisme, elle permet au moins de contenir l'infection, laissant le temps au système immunitaire adaptatif de s'activer. Ce dernier dispose de deux moyens d'action : l'immunité humorale et l'immunité cellulaire. L'immunité humorale est principalement représentée par des immunoglobulines sécrétées par les plasmocytes, eux-mêmes différenciés à partir des lymphocytes B. Elle a pour fonction d'inactiver les microorganismes directement dans les liquides de l'organisme. Cependant de nombreux agents indésirables (virus, mycobactérie etc...) ont la capacité d'infecter les cellules et échappent ainsi à l'immunité humorale. C'est alors que l'immunité cellulaire, par l'intermédiaire des lymphocytes T CD8, prend le relais en détruisant spécifiquement les cellules infectées.

Néanmoins, il existe des circonstances dans lesquelles le système immunitaire n'est pas capable d'empêcher le développement de l'agent pathogène dans l'organisme.

Dans certains cas, c'est une question de rapidité : le microorganisme se propage si vite que le système immunitaire n'a pas le temps de s'activer avant que les conséquences néfastes ne surviennent. C'est ce qui se produit au cours de la plupart des infections virales ou bactériennes pathogènes.

Dans d'autres cas, c'est le fonctionnement du système immunitaire lui-même qui est compromis, soit par l'agent infectieux lui-même, comme le VIH, soit dans une situation iatrogène, comme chez les individus greffés. Les virus dont les réactivations sont normalement contrôlées et asymptomatiques ont alors le champ libre et se développent avec des conséquences pathologiques.

Outre les agents microbiens, la transformation de cellules saines en cellules tumorales est une autre grande cause de perturbation de l'intégrité de l'organisme. Longtemps controversé, il est maintenant bien établi que le système immunitaire exerce une veille anti-tumorale (Dunn *et al.*, 2002). Néanmoins, que ce soit à cause d'une faible immunogénicité ou à cause d'une apparition dans une zone peu favorable à l'initiation d'une réponse immunologique, le système immunitaire reste souvent inefficace pour empêcher la survenue de cancer.

Introduction

Les scientifiques et le corps médical imaginent et mettent en œuvre depuis longtemps des stratégies préventives ou thérapeutiques pour pallier les défauts d'activation du système immunitaire. Ces stratégies sont regroupées sous le terme d'immunothérapie. On distingue classiquement deux catégories d'immunothérapie : l'immunothérapie active et l'immunothérapie passive.

L'immunothérapie active ou vaccination consiste à fournir à l'organisme une source d'antigènes non pathogène afin que le système immunitaire ait le temps de se sensibiliser efficacement. L'immunothérapie passive ou adoptive repose sur l'injection directe d'effecteurs, qui peuvent être soit des anticorps soit des cellules (immunothérapie cellulaire).

Dans l'introduction qui va suivre, je vais présenter d'abord les circonstances dans lesquelles des stratégies d'immunothérapie passive sont envisagées, ainsi que quelques essais cliniques représentatifs, en me focalisant sur le transfert de lymphocytes T CD8. Puis, je préciserai les caractéristiques d'activation des lymphocytes T CD8 et les conditions nécessaires à la génération et au maintien d'une réponse mémoire à long terme.

I. INDICATIONS DE L'IMMUNOTHERAPIE CELLULAIRE PASSIVE

A. Rétablir une immunité anti-virale

1. Grefe de moelle osseuse

La prise en charge thérapeutique des hématopathies malignes comme la leucémie myéloïde chronique (LMC) et les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) ou myéloblastiques (LAM) repose sur l'administration de traitements cytotoxiques lourds visant à détruire les cellules cancéreuses, qui vont inévitablement détruire également les cellules souches hématopoïétiques. La greffe de moelle osseuse allogénique effectuée dans un second temps, permettra d'assurer la reconstitution immuno-hématologique. L'effet indésirable majeur de ces thérapies est la survenue de la maladie du greffon contre l'hôte (GvH ou GvHD, *Graft versus Host Disease*), qui se caractérise par l'activation des cellules immunocompétentes du greffon contre les HLA allogéniques du receveur, aboutissant à une inflammation généralisée et à des atteintes organiques multiples. Cette reconnaissance allogénique peut également être bénéfique si elle se dirige contre les cellules tumorales résiduelles. C'est l'effet GvL (*Graft versus Leukemia*). Il a été démontré que les effets GvL et GvH passent principalement par les lymphocytes T du donneur présents dans le greffon (Maraninchi *et al.*, 1987; Ferrara *et al.*, 1991). Les lymphocytes T du greffon ont également un rôle bénéfique dans la reconstitution d'une immunité dirigée contre les herpesvirus (Lucas *et al.*, 1996).

Le groupe des herpesvirus est une vaste famille du virus, représentée principalement chez l'homme par les virus de l'EBV (*Ebstein Barr Virus*) et du CMV (*Cytomégalo virus*).

Le virus de l'EBV infecte et immortalise les lymphocytes B *in vitro* et *in vivo*, résultant en une activation et une prolifération polyclonale. Environ 90% des individus adultes sont porteurs de ce virus. Le virus pénètre dans l'organisme par les voies respiratoires et se multiplie dans les cellules de l'oropharynx. Une fois libéré, il infecte les lymphocytes B. La primo-infection peut se manifester par une mononucléose infectieuse, mais tout comme les réactivations, elle est souvent inapparente. Chez un sujet sain les réactivation virales sont contrôlées par les lymphocytes T CD8 anti-EBV, avec un rôle moindre joué par l'immunité anti-humorale et les NK (*Natural Killer*). Chez un individu immunodéprimé, la prolifération des lymphocytes B transformés par l'EBV n'est plus contrôlée, ce qui peut aboutir à la défaillance d'un organe consécutive à l'infiltrat lymphocytaire, ou à l'évolution de la

prolifération polyclonale vers un lymphome malin monoclonal (Shapiro *et al.*, 1988). Chez les patients ayant reçu une greffe de moelle allogénique, l'évolution vers un lymphome EBV est associé à une très forte mortalité (Fischer *et al.*, 1991). Dans la plupart des cas, la lignée B tumorale provient du donneur (Thomas *et al.*, 1991).

De manière similaire, l'infection par le virus du CMV est normalement bien contrôlée par les lymphocytes T CD8. L'altération de ce contrôle immunologique chez les patients immunodéprimés aboutit fréquemment à des réactivations pathologiques du virus du CMV. L'utilisation de ganciclovir en prophylaxie permet de réduire l'incidence des maladies à CMV, mais des réactivations tardives restent communes. Des études ont clairement établi la corrélation entre la reconstitution d'une immunité anti-CMV après une greffe de moelle allogénique et l'incidence diminuée des maladies à CMV (Quinnan *et al.*, 1982; Li *et al.*, 1994).

C'est pourquoi l'utilisation de greffons T-déplétés, dont l'objectif premier est de diminuer les risques de GvH, tend à être complétée par de l'immunothérapie cellulaire passive qui consiste à injecter conjointement ou à distance de la greffe des lymphocytes T du donneur (Dazzi *et al.*, 1998).

a. Rétablir une immunité anti-EBV

Les lymphocytes T injectés pour rétablir une immunité anti-EBV sont de trois types, selon la proportion de cellules spécifiques contenues dans les cellules injectées : les lymphocytes totaux du donneur (DLI, *Donnor Lymphocyte Infusion*), des lymphocytes T enrichis en effecteurs de spécificité connue, ou des lignées T spécifiques.

L'injection de lymphocytes totaux du donneur peut être menée avec deux objectifs : favoriser une rémission de la leucémie (effet GvL), qui donne des résultats très positifs dans certaines formes (Kolb *et al.*, 1995) ou instaurer une immunité anti-virale. Papadopoulos *et al.* ont été les premiers à montrer, chez cinq patients ayant subi une greffe de moelle, que l'injection de lymphocytes totaux du sang périphérique du donneur permettait des réponses complètes à des lymphomes EBV. L'état de rémission, atteint entre 14 et 30 jours après l'injection, a été maintenu sans traitement supplémentaire pendant 10 à 16 mois (Papadopoulos *et al.*, 1994). Néanmoins, puisque toutes les cellules injectées sont potentiellement compétentes et que toutes ne sont pas dirigées contre l'EBV, ces stratégies ont comme complication majeure le développement accru de GvH (Heslop *et al.*, 1994; Papadopoulos *et al.*, 1994). Pour lutter contre cet effet, il est possible d'injecter des lymphocytes T totaux modifiés génétiquement par des gènes « suicides », comme le gène de la thymidine kinase issue du virus *herpes*

simplex de type 1. En cas de survenue de GvH, l'administration de ganciclovir permet l'élimination des cellules injectées (Bonini *et al.*, 1997; Tiberghien *et al.*, 2001).

Les essais suivants ont été menés en injectant préférentiellement des lignées T spécifiques du lymphome B autologue. Les injections sont réalisées de manière prophylactique ou thérapeutique. Dans une étude menée chez trois patients déjà porteurs de lymphome, Rooney *et al.* ont montré que l'injection de lignées T anti-EBV marquées (transfectées pour exprimer le gène de résistance à la néomycine) survivaient dix semaines *in vivo*. L'immunothérapie a été associée à un retour à la normale des taux d'ADN viral en périphérie, et à une rémission complète de la maladie chez un patient (Rooney *et al.*, 1995). Dans une étude suivante élargie à un plus grand nombre de patients, Rooney *et al.* ont pu démontrer l'intérêt clinique de cette stratégie en prophylaxie chez 39 patients, dont aucun n'a développé de lymphome secondaire à la greffe de moelle (contre 7 sur 61 dans le groupe contrôle, $p < 0,03$) (Rooney *et al.*, 1998).

b. Rétablir une immunité anti-CMV

Des essais cliniques pour rétablir une immunité anti-CMV chez des patients ayant subi une greffe de moelle ont également été rapportés. Un premier essai mené par l'équipe de Greenberg a montré que l'injection n'était pas toxique et que les cellules injectées conservaient leur activité *in vivo* (Riddell *et al.*, 1992). La bonne survie des clones injectés a été confirmée dans un autre protocole. Dans cet essai, aucun des quatorze patients traités n'a développé de maladie à CMV (Walter *et al.*, 1995). Un essai plus récent a été mené chez les individus qui ne répondent pas à une thérapie classique par ganciclovir. Chez cinq des patients (sur sept traités), la thérapie cellulaire a permis des diminutions de charge virale associée à des augmentations de fréquences des lymphocytes T CD8 anti-CMV effecteurs. Cependant, parmi les vingt et un patients éligibles au départ, six n'ont pas été traités car pour leur donneur respectif, il n'a pas été possible d'amplifier les lymphocytes spécifiques (Einsele *et al.*, 2002). Un essai clinique très récent a utilisé pour la première fois la technologie du tri par tétramère HLA (marquage tétramère HLA couplé à la phycoérythrine puis utilisation de billes anti-phycoérythrine) pour isoler et réinjecter directement les populations spécifiques dirigées contre les épitopes antigéniques pp65 et IE1. Les donneurs ont été sélectionnés sur la base du pourcentage de cellules spécifiques circulantes dans le sang périphérique, et les populations isolées par cette technique étaient pures à 99%. Cette approche novatrice ne nécessite pas d'amplification lymphocytaire préalable, ce qui permet de réduire considérablement les délais avant injection. Les auteurs montrent que la faible quantité de cellules injectées (de $1,2 \cdot 10^4$ à $2 \cdot 10^6$ lymphocytes T spécifiques) s'est multipliée *in vivo*, ce qui tient peut-être au fait que les

lymphocytes n'ont pas été manipulés *ex vivo* avant le transfert. Ces injections à neuf patients ont permis de rétablir une immunité cellulaire efficace, associée à une nette diminution de la virémie, et à une forte tendance à avoir moins recours au ganciclovir que dans le groupe contrôle. Deux des patients ont cependant présenté des signes de GvH contrôlables (Cobbold *et al.*, 2005). Ces résultats sont très encourageants, également puisqu'ils valident dans ce contexte l'hypothèse selon laquelle des lymphocytes T réactifs contre un seul épitope antigénique peuvent suffire à moyen terme pour empêcher la survenue de maladie à CMV.

2. Greffe d'organes solides

Chez des patients recevant des greffes d'organes solides, un état d'immunosuppression est également instauré, généralement par l'utilisation de ciclosporine A pour éviter le rejet de l'organe transplanté. Outre la toxicité propre du traitement, une des complications majeures est l'apparition de syndromes lymphoprolifératifs de cellules B infectées par l'EBV. Les solutions thérapeutiques, qui résident en premier lieu en une tentative de diminution de l'état d'immunosuppression, associée à des molécules anti-virales et à de la chimiothérapie permettent d'observer des rémissions dans une majorité des cas (Gross *et al.*, 1998; Schaar *et al.*, 2001). Cependant, ces thérapies restent lourdes et non dénuées de toxicité. Dans ce contexte, les stratégies d'immunothérapie cellulaire telles que celles appliquées dans les greffes de moelle semblent donc proposer une alternative séduisante. Néanmoins il existe des différences fondamentales entre les deux types de greffe. Dans la plupart des greffes d'organes solides, les lymphoproliférations B sont issues de cellules du receveur (Thomas *et al.*, 1991). Ceci nécessite d'injecter au receveur ses propres cellules ou des cellules d'un donneur apparenté. Le réveil d'une réponse immunologique, même spécifique, suite à de l'immunothérapie cellulaire risque de déclencher un rejet de l'organe transplanté. De plus, dans les transplantations d'organes solides, l'immunosuppression médicamenteuse sera très probablement maintenue à moyen ou long terme, ce qui peut empêcher les fonctions effectrices des lymphocytes T injectés.

Quelques essais ont toutefois été menés chez l'homme. Emanuel *et al.* ont injecté des lymphocytes T CD3⁺ totaux provenant d'un membre de la fratrie à un patient de onze ans développant un lymphome EBV cérébral post greffe de poumon. Trois injections de 1.10^6 cellules ont permis d'instaurer une rémission complète de la maladie pendant au moins trois ans (Emanuel *et al.*, 1997). Chez sept patients (4 EBV⁺ et 3 EBV⁻), Nalesnik *et al.* ont injecté

entre 5.10^9 et 5.10^{10} PBL autologues pré-cultivés en présence de fortes doses d'IL2 (LAK-*Lymphokine Activated Killer*). Les injections ont été associées à des épisodes de rejet maîtrisables chez deux des trois patients (parmi les EBV+) qui ont répondu au traitement (Nalesnik *et al.*, 1997). Comoli *et al.*, en 2002 ont choisi de développer une stratégie préventive qui consiste en deux à quatre injections de 2.10^7 cellules/m² de lignées T anti-EBV autologues. Parmi les sept patients injectés, aucun n'a manifesté de signes de rejet, et chez cinq d'entre eux, l'injection de cellules a été associée à une diminution de la charge virale (Comoli *et al.*, 2002).

3. Maladie de Hodgkin

Dans environ 50% des cas, le lymphome de Hodgkin est associé à la présence d'EBV dans les cellules de Reed-Sternberg (Staratschek-Jox *et al.*, 2000). Cette maladie se développe chez des individus immunocompétents, mais des mécanismes d'échappement à la surveillance immunologique ont été identifiés chez les cellules proliférantes infectées, comme la diminution d'expression de certains antigènes (Poppema *et al.*, 1998). La chimiothérapie ne permet pas d'éviter de manière satisfaisante la fréquence des rechutes, et le pronostic de cette maladie reste sombre (Beaty *et al.*, 1995). Dans ce contexte, une étude récente a réalisé un essai d'immunothérapie passive en injectant à quatorze patients des lymphocytes T autologues amplifiés contre une lignée B transformée. Par cette méthode, les lignées polyclonales T obtenues sont spécifiques de plusieurs épitopes. Les auteurs ont montré que les cellules injectées sont capables de survivre jusqu'à douze mois et de se multiplier *in vivo*. Des diminutions de charge virale ont été enregistrées, et chez cinq patients, des rémissions complètes allant jusqu'à trente huit mois après l'injection ont été observées (Bollard *et al.*, 2004).

4. Infection par le VIH

Plusieurs observations indépendantes suggèrent que les lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CTL) jouent un rôle critique dans le contrôle de l'infection par le VIH. Des CTL spécifiques du virus sont détectés rapidement après la contamination et leur présence est corrélée à une diminution transitoire de la virémie durant l'infection primaire (Borrow *et al.*, 1994; Ogg *et al.*, 1998). De plus, dans un modèle simien d'infection, l'injection d'anticorps anti-CD8

bloquant entraîne une augmentation massive de la charge virale dans le sang (Matano *et al.*, 1998). Ces observations laissent entrevoir la possibilité d'enrayer le développement de l'infection par l'injection d'effecteurs lymphocytaire T CD8. Les essais cliniques sont cependant très peu nombreux.

Quelques équipes ont mené des essais cliniques par injection de clones anti-viraux chez des patients infectés. En 1995, un premier essai mené chez un patient a consisté à injecter un clone dirigé contre un épitope de la protéine virale Nef. Cette tentative a abouti à l'émergence de virus mutants ayant perdu l'expression de cette protéine (Koenig *et al.*, 1995), ce qui illustre les limites potentielles des stratégies ne ciblant qu'un seul épitope. Un essai mené en 1997 a consisté à injecter des lymphocytes T CD8 autologues amplifiés *ex vivo* pour les enrichir en lymphocytes spécifiques de plusieurs épitopes viraux. Les auteurs ont montré que l'injection n'était pas toxique, mais ils n'ont pas obtenu d'amélioration significative de la charge virale des patients (Lieberman *et al.*, 1997). Certains auteurs ont montré que les clones injectés avaient la capacité de migrer vers les ganglions lymphatiques, et qu'ils conservaient leur capacité lytique *in vivo* (Brodie *et al.*, 1999; Brodie *et al.*, 2000). Dans d'autres tentatives de transfert en revanche, les clones sont rapidement détruits par apoptose après injection (Tan *et al.*, 1999b).

Les résultats sont donc restés modestes et cette stratégie semble abandonnée, puisqu'à ma connaissance, aucun autre essai n'a été publié depuis l'année 2000.

B. Conférer une immunité anti-tumorale

1. Rationnel à l'utilisation de l'immunothérapie anti-tumorale

Paul Ehrlich fut le premier à envisager que le système immunitaire pouvait exercer un contrôle sur le développement de maladies néoplasiques. Toutefois, cette idée a été abandonnée jusqu'à la deuxième moitié du XX^{ème} siècle. Grâce au développement de l'immunologie fondamentale, le concept de surveillance anti-tumorale immunitaire fut repris par Burnet en 1957. Au même moment, Lewis Thomas suggéra qu'une des fonctions principales de l'immunité cellulaire était de maintenir l'homéostasie des organismes multicellulaires complexes en les protégeant des maladies néoplasiques. Plus tard, Burnett suggéra que les lymphocytes pouvaient agir comme des sentinelles en reconnaissant et éliminant les cellules transformées de l'organisme (Dunn *et al.*, 2002).

Des données cliniques récentes appuient l'hypothèse d'une immunosurveillance anti-tumorale dans la mesure où l'incidence des maladies tumorales, d'origine virale ou non, chez des patients immunodéprimés est augmentée, que ce soit chez des patients ayant reçu des traitements immunosuppresseurs suite à des greffes (Penn, 1999) ou chez des individus infectés par le VIH (Goedert *et al.*, 1998). Un deuxième faisceau de preuves chez l'homme est apporté par la corrélation, établie dans plusieurs types de cancer, entre une infiltration tumorale par des lymphocytes et une meilleure survie des patients (Clemente *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2003). La présence particulièrement déterminante des lymphocytes T CD8 infiltrants a été documentée (Naito *et al.*, 1998; Nakano *et al.*, 2001).

Dans le mélanome, l'immunothérapie semble être une approche particulièrement indiquée, puisque certains patients présentent des signes d'immunisation naturelle contre leur propre tumeur (Valmori *et al.*, 2002).

2. Interactions cellules tumorales-système immunitaire

Dans des conditions idéales, les cellules de la branche innée du système immunitaire répondent à des signaux de danger provoqués par des perturbations du micro-environnement liées à la progression tumorale. Ces signaux inflammatoires activent les NK, effecteurs innés, qui sont doués d'une activité anti-tumorale et qui activent les cellules présentatrices d'antigène professionnelles comme les cellules dendritiques (DC). Les DC phagocytent des

fragments de cellules tumorales et présentent, entre autres des antigènes spécifiques de tumeur à leur surface. Elles migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques pour initier une réponse par les lymphocytes T et B. Ces effecteurs vont pouvoir exercer une activité de destruction spécifique des cellules tumorales. Malgré ce processus de surveillance, l'apparition clinique de masse tumorale indique que le cancer en développement a été capable d'éviter la reconnaissance (ignorance immunologique) ou la destruction (phénomène de tolérance ou échappement tumoral) par le système immunitaire.

Plusieurs éléments contribuent à l'ignorance immunologique des tumeurs. Il faut que le développement tumoral soit associé à l'expression de néo-antigènes dans un contexte inflammatoire suffisamment fort pour qu'il y ait une activation des DC puis des lymphocytes T. De plus, l'ignorance immunologique peut provenir de la localisation de la tumeur, qui n'est pas forcément accessible aux cellules du système immunitaire (Ochsenbein *et al.*, 1999).

Plusieurs mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire sont identifiés. Parmi les plus décrits, on trouve : la perte par les cellules tumorales de l'expression des molécules de classe I ou des antigènes (Garcia-Lora *et al.*, 2003), la sécrétion de facteurs solubles immunorégulateurs (Gorsch *et al.*, 1992), l'induction d'une réponse T inefficace (Staveley-O'Carroll *et al.*, 1998; Sheu *et al.*, 2001; Woo *et al.*, 2001) ou la résistance des cellules tumorales à la lyse des lymphocytes T (Irmeler *et al.*, 1997; Hersey *et al.*, 2001).

3. Les stratégies d'immunothérapie cellulaire passive par transfert de lymphocytes T CD8

Les stratégies d'immunothérapie cellulaire passive anti-tumorale consistent à injecter le plus grand nombre possible d'effecteurs cellulaires. Cette approche permet de s'affranchir en partie de l'ignorance immunologique et d'un certain nombre des mécanismes d'échappement mentionnés, mais doit aussi tenir compte d'un certain nombre de contraintes. En particulier, les cellules injectées doivent être capables de migrer vers les sites tumoraux. De plus, les cellules doivent être capables de survivre chez l'individu suffisamment longtemps pour initier une réponse, l'idéal étant qu'elles puissent se multiplier *in vivo*. C'est par le suivi immunologique des protocoles cliniques que ces informations peuvent être obtenues *a posteriori*.

a. Immunothérapie cellulaire passive non spécifique d'antigène : injection de LAK

Les premiers essais d'immunothérapie passive ont consisté en la ré-injection de cellules appelées LAK (*Lymphokine Activated Killer*) obtenues par la culture de lymphocytes du sang périphériques en présence de fortes doses d'IL2. Il avait en effet été établi que ces cellules étaient capables de lyser des cellules tumorales (Grimm *et al.*, 1982; Mule *et al.*, 1984). Des doses massives d'IL2 étaient associées à l'injection, visant à générer ces mêmes cellules *in vivo* (Rosenberg *et al.*, 1987). Ces traitements ont permis des régressions ou des stabilisations des croissances tumorales sporadiques, mais étaient relativement toxiques et mal tolérés, principalement à cause de l'IL2 (Dutcher *et al.*, 1991; Kruit *et al.*, 1997). Finalement, une étude prospective a montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre une thérapie par LAK et une thérapie par IL2 seule chez des patients atteints de carcinome rénal métastatique ou de mélanome (Rosenberg *et al.*, 1993).

b. Immunothérapie cellulaire passive spécifique d'antigène

- Injection de TIL (*Tumor Infiltrating Lymphocytes*)

Les TIL sont des lymphocytes qui infiltrent les tumeurs. Plusieurs études ont montré que parmi ces TIL, il y avait des lymphocytes T CD8 spécifiques de la tumeur et qu'ils étaient capables de la lyser *in vitro*. A partir d'un fragment de tumeur, il est possible d'isoler et de cultiver ces cellules *ex vivo* en présence d'IL2. Ainsi, différents essais d'immunothérapie basés sur la ré-injection de grandes quantités de TIL amplifiés *ex vivo* ont été menés.

L'intérêt thérapeutique des TIL a d'abord été montré chez la souris. L'équipe de Rosenberg a montré que la ré-injection de TIL entraînait la disparition de métastases hépatiques et pulmonaires (Rosenberg *et al.*, 1986).

Chez l'homme, plusieurs essais cliniques par injection de TIL associés à de l'IL2 ont été menés. Des réponses immunologiques sont fréquemment observées, et dans un certain nombre de cas, les traitements sont associés à des réponses cliniques.

Un premier essai clinique significatif de part le nombre de patients inclus (86) a consisté à injecter des TIL associés à de fortes doses d'IL2 (doses maximales tolérées par les patients) chez des patients atteints de mélanome métastatique. Des taux de réponses objectives de 34% ont été enregistrés, contre 31% par un traitement par IL2 seule. La fréquence des réponses au traitement est cependant significativement plus importante chez les patients traités par des

TIL issus de cultures jeunes, qui se divisent le plus rapidement et qui sont les plus cytotoxiques vis-à-vis de la tumeur autologue (Rosenberg *et al.*, 1994). Ces résultats illustrent que les conditions d'amplification *ex vivo* des cellules injectées influencent les réponses cliniques ou immunologiques *in vivo*. Plus tard, le même groupe a mené un autre essai en administrant des TIL après un conditionnement « non myéloablatif » (déplétion lymphocytaire sévère induite par du cyclophosphamide et de la fludarabine) chez des patients atteints de mélanomes. Les auteurs justifient la lymphodéplétion comme une stratégie permettant d'augmenter la survie des lymphocytes T injectés par des mécanismes d'homéostasie, et d'augmenter leur efficacité en éliminant les populations régulatrices. Des régressions cliniques objectives ont été observées chez six patients parmi les treize évaluables, avec une démonstration de la survie prolongée et de la multiplication des TIL injectés dans le sang des patients (plus de quatre mois), et de leur migration dans la tumeur. Cinq patients ont développé une réponse auto-immune de type vitiligo (dépigmentation cutanée) ou uvéite. Ces réponses et les régressions tumorales, souvent associées chez un même patient, tendent à confirmer le rôle des TIL spécifiques de ces antigènes dans l'effet thérapeutique obtenu. Deux patients ont cependant développé des effets secondaires graves : un lymphome B-EBV et une infection par un virus syncytial, deux maladies dont on sait que l'émergence est favorisée par des traitements immunosuppresseurs. Ils montrent également que chez deux des patients traités c'est une sous-population de lymphocytes T CD8 clonale (dérivée d'un seul lymphocyte) et spécifique du même antigène mélanocytaire, Melan-A/MART-1, qui a survécu et s'est multipliée dans le sang, jusqu'à représenter la majorité des lymphocytes T CD8 circulants (Dudley *et al.*, 2002). Cette étude a été poursuivie, et sur trente-cinq patients traités, dix-huit réponses objectives ont été enregistrées, dont trois réponses complètes (Dudley *et al.*, 2005).

L'équipe de Francine Jotereau s'intéresse depuis longtemps à l'immunothérapie adoptive du mélanome. Elle a réalisé un essai randomisé incluant quatre-vingt-huit patients, afin de tenter d'établir l'efficacité clinique de l'injection de TIL+IL2 versus l'IL2 seule. Bien que le pourcentage de survie sans rechute des deux groupes ne soit pas significativement différent, une analyse par sous-groupe révèle une survie plus longue des patients porteurs d'un seul ganglion envahi et traités par injection de TIL. Parmi les trente-quatre patients concernés (un seul ganglion envahi), le taux de survie sans rechute est de 66% pour le sous-groupe traité par TIL+IL2, contre 31% pour les patients traités par l'IL2 (Dreno *et al.*, 2002). Ce résultat illustre que les meilleures chances de réussite de l'immunothérapie sont associées à des stades moins avancés de la maladie. L'analyse fonctionnelle des TIL injectés a permis de montrer

que la survie est corrélée à la présence, parmi les TIL injectés de lymphocytes réactifs vis-à-vis de la tumeur autologue (Labarriere *et al.*, 2002). Des conclusions similaires avaient été apportées par une étude prospective du groupe de Rosenberg (Kawakami *et al.*, 1995).

L'utilisation de TIL ne nécessite pas la caractérisation préalable d'antigènes de tumeurs, et peut permettre d'injecter des effecteurs dont la spécificité antigénique n'est pas connue. Néanmoins, il s'avère que les TIL ne contiennent pas toujours des proportions significatives de lymphocytes T qui reconnaissent la tumeur. Malheureusement, ces études de caractérisation, qui nécessitent de disposer de la lignée tumorale autologue, peuvent difficilement être menées avant l'injection au patient. De plus, l'obtention de grandes quantités de cellules à partir de la tumeur (ou des ganglions envahis par la tumeur) est un processus lourd qui freine le développement de ces stratégies.

- Injection de populations CD8 enrichies en lymphocytes T spécifiques

Des cellules spécifiques des antigènes tumoraux sont également détectées dans le sang périphérique de patients, parfois à des fréquences assez élevées, en particulier dans le contexte Melan-A/MART-1 (Pittet *et al.*, 1999). Ainsi, dans les protocoles cliniques actuels, les cellules injectées aux patients proviennent généralement d'échantillons de sang périphérique, plus faciles à obtenir. Les lymphocytes T CD8 totaux peuvent être stimulés *ex vivo* de manière antigène-spécifique afin de garantir un enrichissement en lymphocytes T spécifiques. Ainsi, dans un essai clinique récent, Meidenbauer *et al.* ont injecté à huit patients porteurs de mélanomes avancés et réfractaires aux traitements standards, des cellules T CD8 enrichies en lymphocytes T anti Melan-A/MART-1 obtenus par re-stimulation par des DC chargées en peptide. Les populations injectées contenaient en moyenne 42% de lymphocytes spécifiques, ce qui représentait de 0,25 à 11.10^8 cellules. Afin de suivre leur devenir dans l'organisme, l'ensemble a été préalablement marqué par un radio-élément (indium-111). Il n'y a pas de résultats cliniques associés à l'étude, mais les auteurs montrent que les cellules injectées se localisent dans les poumons, la rate et le foie et dans les lésions métastatiques et sont capables de survivre dans l'organisme pendant quelques semaines (Meidenbauer *et al.*, 2003).

Un essai similaire a été réalisé avec des cellules amplifiées contre un épitope de l'antigène tyrosinase (Mitchell *et al.*, 2002). La stimulation pour enrichir en lymphocytes T spécifiques a été effectuée par des cellules de drosophiles transfectées par du HLA et des molécules de co-stimulation chargées en peptide antigénique. Les auteurs ne détectent pas de cellules

spécifiques en périphérie, mais leur présence est évaluée par dilution limitante, une technique réputée moins sensible que le marquage tétramère HLA (Tan *et al.*, 1999a).

- Injection de clones spécifiques

Une autre stratégie vise non plus à injecter des TIL mais des clones T CD8⁺ dirigés contre des épitopes antigéniques spécifiques de la tumeur. Cette approche est séduisante car les caractéristiques des clones (spécificité, avidité, fonctions effectrices) peuvent être déterminées avant l'injection, rendant l'interprétation des résultats plus évidente. Le développement de cette approche a été rendu possible par la caractérisation fine de nombreux antigènes tumoraux (Wang *et al.*, 1999).

Un essai de phase I a été mené par le groupe de Greenberg chez dix patients atteints de mélanome métastatique. Les clones ont été sélectionnés pour leur spécificité contre les antigènes mélanocytaires Melan-A/MART-1 ou gp100 et sont injectés accompagnés ou non d'IL2, mais sans conditionnement immunosuppresseur préalable. Les réponses observées dans cet essai consistent essentiellement en une stabilisation de la maladie pouvant aller jusqu'à 21 mois. Pourtant, des arguments immunologiques intéressants sont rapportés : chez un patient, trois jours après l'injection, les clones injectés représentaient plus d'un tiers des lymphocytes CD8 infiltrant une des tumeurs, ce qui suggère l'existence d'une migration ou d'une accumulation préférentielle des lymphocytes injectés dans le site tumoral. Il a également été noté la perte d'expression de l'antigène reconnu par ces lymphocytes par une autre tumeur ayant régressé transitoirement (Yee *et al.*, 2002). Le groupe de Rosenberg aussi a mené un essai de phase I par injection de clones associés à différentes doses d'IL2, chez des patients porteurs de mélanome avancé, et ayant préalablement subi un traitement immunosuppresseur. Ils n'ont pas observé de réponse clinique objective, et les clones injectés n'ont pas survécu longtemps en périphérie (Dudley *et al.*, 2001).

Très récemment, notre équipe a publié les résultats du suivi immunologique d'un essai basé sur l'injection de un ou deux clones T CD8 spécifiques de Melan-A/MART-1 chez dix patients porteurs de mélanome. Les clones ont été obtenus par stimulation de lymphocytes T CD8 des patients par une lignée tumorale allogénique (Gervois *et al.*, 2000). Les clones injectés ont été retrouvés chez trois patients, pendant des périodes allant de 7 à 60 jours. Chez six patients, des régressions de métastase ou des stabilisations de la maladie ont été enregistrées, sans qu'il y ait de corrélations avec la persistance des clones en périphérie ou dans les échantillons de tumeur. Cependant, la fréquence des lymphocytes spécifiques de

Melan-A/HLA A*0201, mesuré par marquage tétramère a augmenté après le traitement chez la plupart des patients. Chez un patient, ayant présenté une réponse complète, cette augmentation correspond à l'expansion de nouveaux clonotypes spécifiques de l'antigène ciblé et de meilleure avidité que ceux détectés avant traitement. Ceci suggère que les clones injectés ont pu initier une réponse contre la tumeur et que cela a pu aboutir à l'expansion du répertoire dirigé contre Melan-A/MART-1 (Vignard *et al.*, 2005). Des conclusions similaires ont été apportées récemment à la suite d'un protocole de vaccination par des peptides issus de l'antigène MAGE dans le mélanome (Germeau *et al.*, 2005; Lurquin *et al.*, 2005).

Si ces résultats se confirment, la distinction entre immunothérapie passive ou active pourrait s'avérer moins formelle. Il est en effet très séduisant d'imaginer que le fait de réveiller une réponse immunologique spécifique pourrait relancer un processus plus global de prise en charge de la tumeur par le système immunitaire.

Au stade actuel, les questions qui subsistent quant à l'utilisation de clones T CD8 ou de populations T enrichies sont de 2 types. Quel est l'antigène qu'il faut cibler préférentiellement et y aura-t'il un bénéfice à injecter des populations dirigées contre plusieurs épitopes différents ? Jusqu'à présent, c'est la protéine Melan-A/MART-1 qui est la plus souvent ciblée dans les protocoles cliniques contre le mélanome parce que cet antigène est fréquemment exprimé par les cellules tumorales et parce qu'un large répertoire T dirigé contre cet antigène existe chez les patients. Cependant, un risque potentiel des stratégies qui ne viseraient qu'un seul antigène est de voir la tumeur échapper en perdant son expression, comme cela a déjà été montré suite à un protocole de vaccination peptidique (Lee *et al.*, 1998). L'autre élément inconnu est le degré de différenciation des lymphocytes T CD8 qui est associé à une meilleure efficacité *in vivo*. De nombreuses études des lymphocytes T CD8 dans le contexte viral ont mis en évidence le fait que tous ne présentaient pas les mêmes caractéristiques phénotypiques et que ces différences pourraient être associées à des propriétés effectrices différentes (Appay *et al.*, 2002a; Hislop *et al.*, 2002; Wherry *et al.*, 2003). Il n'y a pas encore d'indications de ce type concernant les lymphocytes T anti-tumoraux qui sont plus difficiles à étudier à cause de leur faible fréquence en périphérie. A terme, il sera important d'évaluer l'impact des conditions d'obtention des cellules sur le phénotype et les caractéristiques des lymphocytes T spécifiques.

II. CARACTERISATION DES LYMPHOCYTES T CD8

A. Reconnaissance antigénique par les lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8

Les travaux de Zinkernagel et Doherty ont montré que les lymphocytes $\alpha\beta$ reconnaissent l'antigène en association avec une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Zinkernagel *et al.*, 1974). Une dizaine d'années plus tard, il a été établi que le ligand antigénique reconnu par les lymphocytes T est formé d'un fragment peptidique logé dans une molécule du CMH (Babbitt *et al.*, 1985; Townsend *et al.*, 1986). Ainsi, la reconnaissance de l'antigène résulte de l'interaction du récepteur du lymphocyte T (TCR) avec le complexe CMH-peptide présent à la surface de la cellule présentatrice de l'antigène.

Les lymphocytes T CD4 reconnaissent des peptides associés au CMH de classe II. Nous nous intéresserons ici aux lymphocytes T CD8, qui reconnaissent les peptides antigéniques présentés par des CMH de classe I.

1. Les molécules CMH de classe I

Les molécules de CMH de classe I sont des glycoprotéines membranaires hétérodimériques exprimées sur toutes les cellules nucléées et les plaquettes. Elles sont constituées d'une chaîne lourde α polymorphe ancrée dans la membrane (44-45kDa) et associée à une chaîne invariante non glycosylée et libre : la β 2 microglobuline (β 2m, 12kDa). Chez l'homme, trois loci majeurs multialléliques appelés HLA A, B, C sont à l'origine de l'expression de la chaîne lourde. Les deux allèles de chaque locus sont exprimés de manière co-dominante, ce qui fait qu'un individu peut exprimer six molécules de classe I différentes. Cette chaîne lourde appartient à la famille des immunoglobulines, elle est constituée de trois domaines extracellulaires α 1, α 2 et α 3, d'une région transmembranaire et d'une portion intra-cytoplasmique. Le polymorphisme est essentiellement porté par les domaines α 1 et α 2, qui sont impliqués dans la présentation antigénique. Ils forment un sillon constitué de deux hélices α anti-parallèles reposant sur un plancher β (Bjorkman *et al.*, 1987). Dans le sillon vient se loger le peptide antigénique (fig. 1).

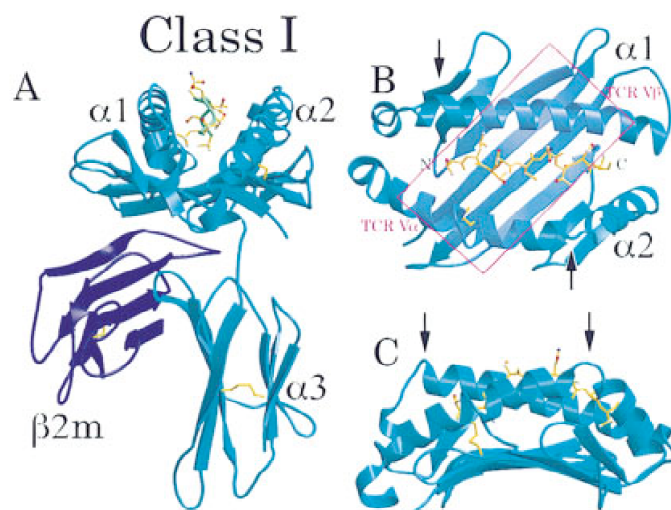


Figure 1. Structure tri-dimensionnelle des molécules du CMH de classe I. A et C : vue latérale. B : vue apicale. La position relative du TCR est illustrée par le rectangle rose (Bjorkman, 1997).

2. Les peptides antigéniques associés aux molécules de classe I

Les peptides associés aux molécules CMH de classe I dérivent de protéines qui ont été dégradées dans le protéasome en fragment de 9 à 10 acides aminés (dans la plupart des cas, mais des peptides plus longs ont été décrits). Ces peptides sont transportés grâce au transporteur TAP vers le reticulum endoplasmique, où ils se lient aux molécules de CMH de classe I. Seuls les peptides qui possèdent les acides aminés d'ancrage (définis selon chaque forme allélique de HLA) pourront se lier aux molécules de CMH (Rammensee *et al.*, 1995). Par exemple, un peptide se fixera de manière optimale dans le HLA-A*0201 si il possède des résidus Leu en position 2 et Val en position 9. Les molécules de classe I correctement chargées en peptide migrent à travers l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane cytoplasmique.

3. Le récepteur des lymphocytes T $\alpha\beta$ (TCR)

a. Structure

Des études cristallographiques ont permis de connaître précisément la structure des TCR (Garboczi *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 1996).

Le TCR est un hétérodimère composé de deux chaînes glycoprotéiques α (40-50kDa) et β (35-50kDa) (fig. 2). Chaque chaîne comprend deux domaines extra-cellulaires, l'un variable (V) et l'autre constant (C), ainsi qu'une région trans-membranaire et une très courte région intra-cytoplasmique. Les domaines $V\alpha$ et $V\beta$ s'associent de façon non covalente, de même

que les domaines C α et C β extra-cellulaires. La liaison entre les deux chaînes est quand même renforcée par un pont disulfure qui s'établit entre les deux parties constantes. Le domaine V est impliqué dans la reconnaissance du complexe CMH-peptide et le domaine C permet l'ancrage dans la membrane et s'associe de manière non covalente avec le complexe invariant CD3 responsable de la transduction du signal d'activation.

Le TCR est distribué de façon clonale à la surface des lymphocytes T, et il est spécialisé dans la reconnaissance des peptides présentés par les molécules de CMH.

b. Interactions du TCR avec le complexe CMH-peptide

Des études par BIAcore (résonance plasmonique de surface) ont permis de mesurer avec précision la cinétique d'association et l'affinité du TCR pour le complexe CMH-peptide. Cette affinité est sensiblement plus faible que celle d'un anticorps pour son antigène, variant de 0,1 μ M à 100 μ M. Les constantes d'association sont très variables d'un complexe à l'autre et la gamme de constantes de dissociation plus étroite et rapide que pour une interaction antigène-anticorps. Le temps de demi-vie du complexe de l'ordre de 12 à 30 sec à 25°C (pour revue, (Davis *et al.*, 1998)).

Un CMH-peptide donné est reconnu par plusieurs TCR pouvant être très différents, et d'affinité variable pour le complexe. C'est ce qui permet une réponse polyclonale variée. Une analyse comparative des structures tri-dimensionnelles de deux TCR distincts contactant le même complexe CMH-peptide a montré que ces deux TCR n'avaient en commun qu'un seul de leurs acides aminés en contact avec le complexe CMH-peptide (Ding *et al.*, 1998). Inversement, et bien que la reconnaissance soit hautement spécifique, un TCR donné peut interagir avec différents complexes CMH-peptide (Mason, 1998). Outre son rôle dans la sélection positive des thymocytes, cette dégénérescence de la reconnaissance T est une des hypothèse expliquant la survenue de maladies auto-immunes suite à des épisodes infectieux par mimétisme moléculaire (Christen *et al.*, 2004).

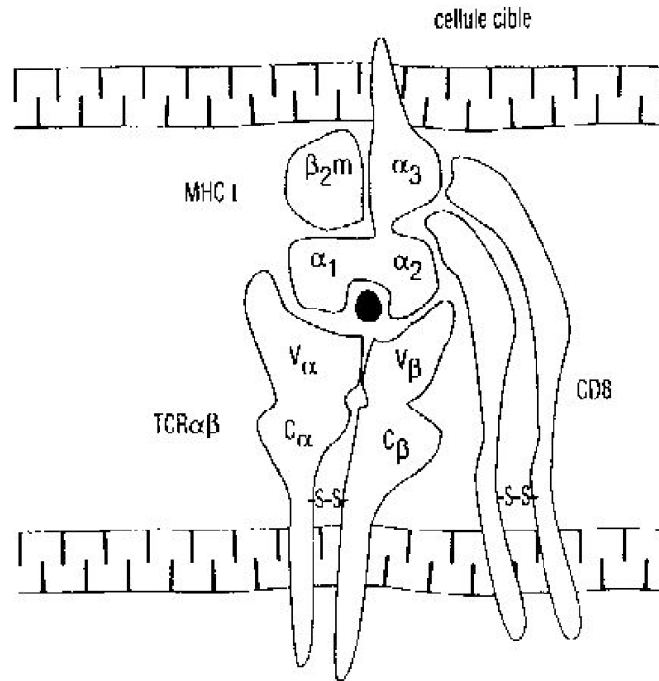


Figure 2. Représentation schématique des interactions entre le TCR et le CD8 avec le complexe CMH-peptide.

c. Génération de la diversité des TCR, maturation et sélection thymique des lymphocytes T

C'est au cours de la maturation thymique des lymphocytes T (débutant vers la huitième semaine de gestation suite à la migration vers le thymus des précurseurs T issus de la cellule souche hématopoïétique) qu'a lieu la formation et la sélection des TCR.

La recombinaison d'un nombre limité de segments de gènes (appelés Variable (V), Diversité (D), Jonction (J) et Constant (C)) permet la génération aléatoire d'un très grand nombre de TCR différents (Davis *et al.*, 1988).

C'est la chaîne β qui est réarrangée en premier par recombinaison entre les segments V, D et J, puis C (Dudley *et al.*, 1994). Si la chaîne β est fonctionnelle, elle s'assemble avec la chaîne invariante pré-T α pour former un pré-TCR exprimé en association avec le CD3. L'expression de ce pré-TCR induit l'arrêt des réarrangements sur le second allèle β par un processus appelé « exclusion allélique » (Malissen *et al.*, 1992). Les cellules poursuivent alors leur différenciation et commencent à réarranger le TCR α , qui n'est pas soumis au processus d'exclusion allélique (il est donc possible qu'un thymocyte exprime deux chaînes α). Ce sont ces mécanismes de réarrangement (donnant lieu à une diversité combinatoire et jonctionnelle) qui sont à l'origine de la diversité du répertoire lymphocytaire T naïf.

Le thymocyte doit ensuite franchir les étapes de sélection positive et négative avant d'arriver en périphérie. La sélection positive assure la survie et la maturation de cellules T ayant un TCR fonctionnel et qui interagit avec les complexes CMH-peptide du soi de façon suffisamment affine pour permettre une reconnaissance. Au cours de la sélection négative, les lymphocytes qui reconnaissent les éléments du soi avec une affinité trop forte sont éliminés par apoptose afin d'éviter le maintien de lymphocytes auto-réactifs (pour revue, (Sebzda *et al.*, 1999)).

Finalement, on considère qu'environ 5% des thymocytes répondent aux conditions de sélection (fig. 3). Une fois ces étapes de sélection franchies, ils sont prêts à partir en périphérie.

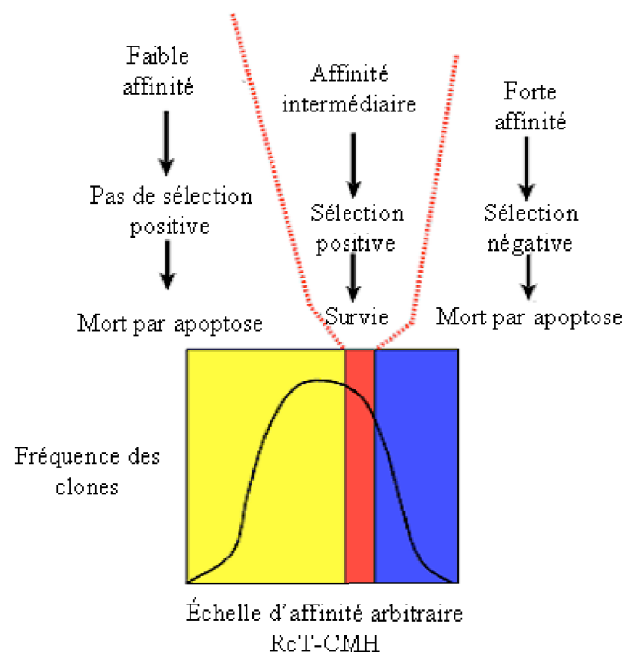


Figure 3. Sélection thymique des lymphocytes T naifs.

4. Le co-récepteur CD8

Le co-récepteur CD8 est exprimé dans la majorité des lymphocytes T thymo-dépendants CD8⁺ sous forme d'hétérodimères CD8 α /CD8 β ou d'homodimères CD8 α /CD8 α (Moebius *et al.*, 1991). Les chaînes α et β du CD8 sont constituées de 4 domaines fonctionnels : un domaine extra-cellulaire, une région charnière proche de la membrane, une région transmembranaire et un domaine cytoplasmique. Par son domaine extra-cellulaire, la molécule de CD8 établit des contacts surtout avec le domaine $\alpha 3$ du CMH, mais également

avec le domaine $\alpha 2$ et la $\beta 2m$. Bien que l'affinité globale du CD8 pour le CMH semble être faible à 37°C (Wyer *et al.*, 1999), cette interaction participe cependant à l'augmentation de l'avidité du lymphocyte pour sa cible. Ceci peut permettre à un clone T ayant un TCR peu affin pour un CMH-peptide de s'activer correctement et de se maintenir en périphérie au cours des re-stimulations successives (al-Ramadi *et al.*, 1995; Couedel *et al.*, 1999). Le CD8 joue aussi un rôle important dans la transduction du signal en s'associant par sa chaîne α avec la protéine kinase p56Lck (Turner *et al.*, 1990). La chaîne β , $\square\square\square\square\square\square\square\square\square\square\square\square\square\square\square$, participe à la translocation de l'ensemble vers les radeaux lipidiques (Arcaro *et al.*, 2000).

Une étude récente chez la souris suggère que l'expression du CD8 α/α par les lymphocytes T CD8 α/β puisse caractériser certains lymphocytes T mémoires (Madakamutil *et al.*, 2004). Cependant, chez l'homme, le ligand du CD8 α/α n'est pas identifié.

5. Complexe CMH-peptide recombinant

La production sous forme recombinante de CMH qui peuvent être chargés à façon avec les peptides d'intérêt constitue un outil technologique qui a beaucoup contribué au développement de l'immunothérapie et à la caractérisation des lymphocytes T CD8.

Pour pallier la faible affinité de l'interaction du TCR avec le CMH-peptide, deux stratégies différentes ont été utilisées. L'approche de Dal Porto *et al.* chez la souris et de Greten *et al.* chez l'homme a consisté à réaliser des protéines chimériques CMH-Ig pour produire des complexes divalents (Dal Porto *et al.*, 1993; Greten *et al.*, 1998). Altman *et al.* ont choisi de produire des complexes CMH-peptide tétravalents en liant 4 monomères biotinylés avec une molécule de streptavidine (Altman *et al.*, 1996). C'est cette stratégie, légèrement modifiée qui a été retenue pour produire les HLA A*0201 recombinants dont nous disposons au laboratoire (Bodinier *et al.*, 2000) (fig. 4). Afin de diminuer la fixation non spécifique au CD8 et ne conserver que l'interaction avec le TCR, la chaîne lourde a été mutée sur un des acides aminés du domaine $\alpha 3$ qui participe à l'interaction avec le co-récepteur (Salter *et al.*, 1990). Cette mutation permet d'améliorer l'efficacité du tri de population spécifique à l'aide de complexes CMH-peptide (Bodinier *et al.*, 2000).

Les applications des multimères de CMH-peptide sont nombreuses : détection des lymphocytes spécifiques d'antigène, études fonctionnelles, isolement de populations d'intérêt (pour revue (Lang *et al.*, 2001)).

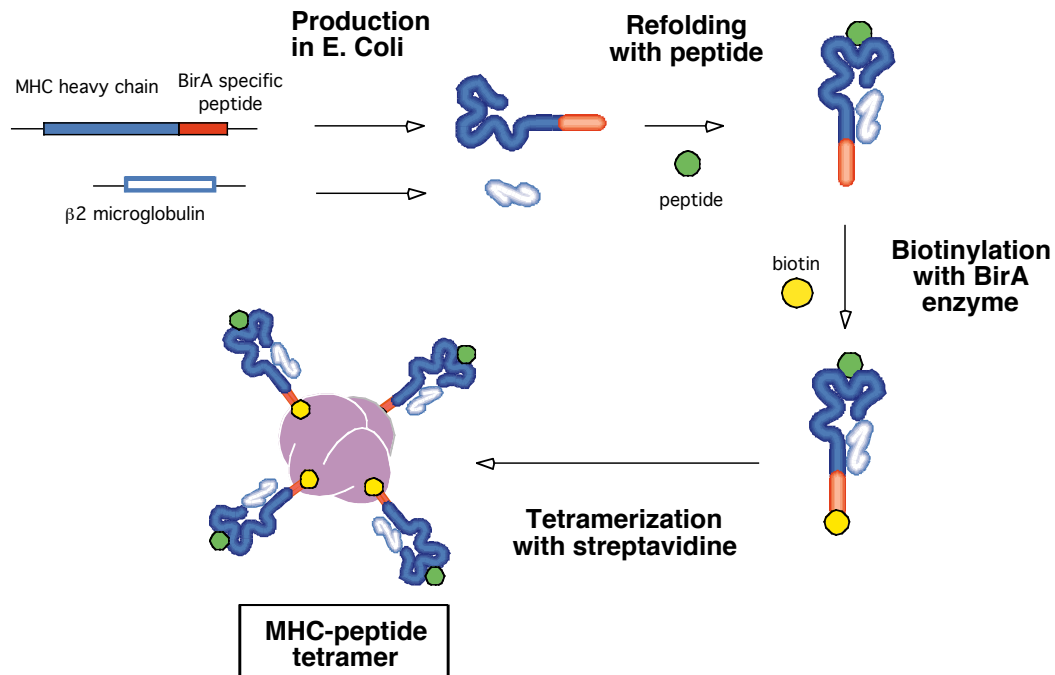


Figure 4. Production de complexes CMH-peptide recombinants (Bodinier, thèse, 2000).

6. Synapse immunologique

Un engagement correct et suffisamment long du TCR est essentiel à l'activation complète du lymphocyte T. Pourtant plusieurs contraintes telles que la faible affinité du TCR pour le CMH-peptide, la faible quantité de ceux-ci à la surface de la cellule présentatrice d'antigène, la présence de grosses molécules comme le CD45 ou le fait que les cellules soient en mouvement pourraient gêner le contact optimal. Par ailleurs, différentes études ont montré la nécessité du recrutement des complexes TCR-CD3 au sein de micro-domaines riches en phospholipides appelés « *rafts* », ou radeaux lipidiques dans lesquels sont concentrées les protéines participant à la transduction du signal (Simons *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998).

Suspecté depuis longtemps (Norcross, 1984), Grakoui *et al.* ont été parmi les premiers à montrer que le contact entre un lymphocyte T CD4 et la CPA passe par la formation d'une synapse immunologique (Grakoui *et al.*, 1999). Cette synapse immunologique est caractérisée par un arrangement moléculaire très organisé. Au début, les complexes TCR/CMH-peptide forment un anneau autour des molécules d'adhésion LFA-1/ICAM-1 (synapse immature). Cet anneau « s'inverse » ensuite et ce sont les complexes TCR/CMH qui se retrouvent au centre (synapse mature). Dès le stade immature, la transduction du signal par le TCR est engagée

(Lee *et al.*, 2002b). La formation de cette synapse requiert une réorganisation du cytosquelette (Tskvitaria-Fuller *et al.*, 2003).

7. Transmission du signal d'activation

Les chaînes α et β du TCR disposent d'un domaine intracytoplasmique trop court pour pouvoir jouer un rôle dans la transduction d'un signal d'activation. Ce rôle est tenu par le complexe CD3 constitué de sous-unités ($\gamma\delta\epsilon_2\zeta_2$) (fig. 5). De manière simplifiée, l'élément déclencheur est la phosphorylation de motifs ITAM portés par les domaines intracytoplasmiques des sous-unités du CD3 par deux protéines à activité tyrosine-kinase : p56Lck et p59Fyn (pour revue, (Cambier, 1995)). C'est le CD8 qui est en grande partie responsable du recrutement de p56Lck au niveau du complexe TCR-CD3 (Veillette *et al.*, 1988; Turner *et al.*, 1990). La p56Lck phosphoryle et active la ZAP-70 associée aux chaînes ζ du CD3, qui par son activité kinase propre phosphoryle, entre autres, LAT (*Linker for Activation of T-cell*). Cette activation par les tyrosine-kinases associées au complexe du récepteur est modulée par des molécules possédant une activité tyrosine phosphatase. Ces protéines, *via* leur domaine SH2 vont pouvoir s'associer aux motifs ITIM phosphorylés (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) et réguler négativement le signal d'activation (pour revue, (Vivier *et al.*, 1997)). LAT est une protéine d'échafaudage dont le rôle est de recruter les effecteurs plus en aval. Ces effecteurs ainsi recrutés au niveau du TCR vont ensuite être activés et interviennent dans les différentes voies tardives de la signalisation que sont la voie des MAP kinases (*Mitogen Activated Protein Kinase*), la voie calcique et la voie NF- κ B.

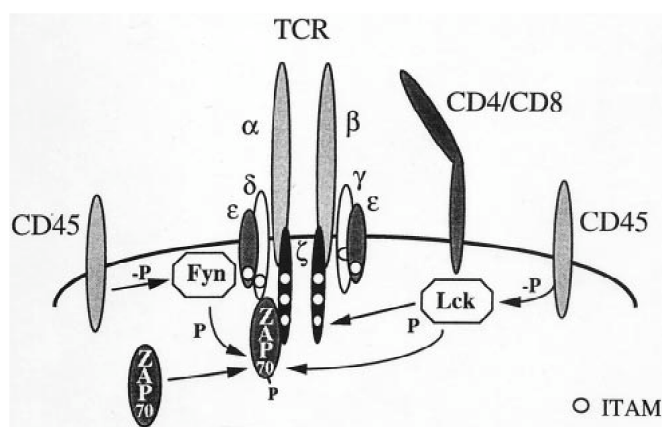


Figure 5. Premiers événements intra-cellulaires de transduction du signal d'activation par le complexe TCR/CD3 (Medema *et al.*, 1999)).

B. Réponses des lymphocytes T CD8

La plupart des études concernant l'activation T ont été menées sur des modèles murins. Les modèles sont soit des modèles d'infections aiguës, pour lesquelles il y a élimination de l'antigène, soit des modèles d'infections chroniques, pour lesquelles il y a persistance de l'antigène. L'analyse de la réponse T CD8 a été grandement facilitée par le développement de la technologie du CMH-peptide recombinant multimérique qui permet une numération et une caractérisation phénotypique des lymphocytes T spécifiques d'un antigène par cytométrie en flux. Les transpositions des résultats obtenus chez la souris à l'homme restent cependant parcellaires.

L'activation d'un lymphocyte T peut être divisée en quatre étapes : initiation, expansion clonale, contraction et génération de cellules mémoires.

1. Initiation de la reconnaissance

Une fois sortis du thymus, les lymphocytes T naïfs en périphérie chez un animal sain ne prolifèrent pas. Leur survie serait maintenue par des contacts avec les molécules CMH-peptide du soi (Tanchot *et al.*, 1997). Les lymphocytes T naïfs expriment des récepteurs fonctionnels pour l'IL7 et l'IL15 ; ces deux cytokines, et en particulier l'IL7, sont impliquées dans l'homéostasie des lymphocytes T naïfs en périphérie (Schluns *et al.*, 2000; Alves *et al.*, 2003). Dans des conditions de déplétion totale en lymphocytes T (thymectomie ou irradiation) ou chez de très jeunes individus, en revanche, il y a prolifération des lymphocytes T naïfs.

Afin d'éviter toute activation inappropriée d'un lymphocyte T naïf, la première stimulation est très soigneusement contrôlée. Le premier contact antigénique a lieu dans les ganglions lymphoïdes périphériques. Les lymphocytes T naïfs migrent préférentiellement vers ces tissus lymphoïdes (Butcher *et al.*, 1996). Les cellules dendritiques (DC) sont les seules cellules présentatrices de l'antigène professionnelles capables d'initier ce premier contact antigénique (pour revue, (Banchereau *et al.*, 1998)). Leur capacité à stimuler les lymphocytes T dépend de leur état d'activation. Les DC immatures agissent en tant que sentinelles au niveau des organes périphériques, où elles phagocytent des débris cellulaires ou des agents pathogènes, dont elles présenteront des fragments peptidiques (épitope antigénique) à leur surface. Elles subissent une maturation en réponse à des signaux inflammatoires, comme le TNF- α et β , et en réponse à des produits d'agents bactériens et viraux

(endotoxines, ARN double brin). Une fois matures, leur capacité de migration est modifiée, elles expriment de forts taux de molécules de co-stimulation, et elles se dirigent préférentiellement vers les ganglions (pour revue, (Guermonprez *et al.*, 2002)). Des signaux complémentaires d'activation peuvent être fournis par les lymphocytes T CD4, qui participent ainsi indirectement à l'activation optimale des lymphocytes T CD8. Par exemple, l'interaction entre le CD40L exprimé par les CD4 activés et le CD40 des DC induit la maturation des DC (Schoenberger *et al.*, 1998).

L'activation correcte d'un lymphocyte T CD8 nécessite la transmission de deux signaux bien coordonnés. Le signal 1 est le signal spécifique transmis par le complexe TCR-CD3. Délivré seul, ce signal rend les cellules anergiques, c'est-à-dire incapables de produire de l'IL2 et de proliférer. Le signal 2 de co-stimulation est fourni par des molécules solubles cytokiniques et par des molécules de co-stimulation membranaires. On distingue deux grandes familles de molécules de co-stimulation membranaires : des membres de la famille du CD28, qui appartiennent à la superfamille des immunoglobulines et des membres de la famille du TNF (voir § D.2).

2. Expansion clonale

Une fois activés, les lymphocytes T entrent dans une phase d'intense prolifération. Ces divisions successives ne nécessitent plus la présence de l'antigène (Kaech *et al.*, 2001; van Stipdonk *et al.*, 2001). Au cours d'une primo-infection par le virus de l'EBV, les lymphocytes T dirigés contre un seul épitope provenant du virus (issu de la protéine lytique BZLF-1) peuvent composer jusqu'à 44% du nombre total des CD8 périphériques (Callan *et al.*, 1998). La prolifération est associée à une différenciation en cellules effectrices, caractérisées par leur capacité à sécréter des cytokines et à lyser les cellules cibles. Les cellules activées expriment de nouvelles molécules de surface caractéristiques, comme le CD69, le CD38, les molécules de classe II. L'antigène nucléaire Ki67 peut également servir de marqueur de cellule activée proliférante (Schluter *et al.*, 1993). L'expression de certaines molécules est perdue suite à l'activation, comme l'expression de CD27, CD62L et CCR7. La perte du CCR7 est associée à l'acquisition par les cellules effectrices de la capacité à migrer vers les organes périphériques, où ils exerceront leur fonctions effectrices (von Andrian *et al.*, 2000).

a. Sécrétion de cytokines

La transduction du signal d'activation par le TCR aboutit *in fine* à l'activation de nombreux gènes nouveaux qui ne sont pas exprimés par les lymphocytes T naïfs. La principale cytokine produite par les lymphocytes T CD8 est l'IFN- γ . L'IFN- γ inhibe la réplication virale et augmente l'expression des CMH de classe I et II. Cette cytokine active les macrophages et les recrute au site d'activation. Une deuxième cytokine produite par les lymphocytes T CD8 est le TNF- α , qui agit en synergie avec l'IFN- γ pour activer les macrophages. Les lymphocytes T CD8 activés acquièrent également, dans une certaine mesure, la capacité à sécréter de l'IL2 (pour revue, (Sprent *et al.*, 2002), qui favorise la différenciation des lymphocytes T activés en effecteurs. L'activation induit parallèlement l'expression membranaire de la chaîne α du récepteur à l'IL2 (CD25) (Smith, 1988), permettant la formation du récepteur de haute affinité (IL2R $\alpha\beta\gamma$). Ainsi, l'IL2 est capable d'exercer une action autocrine positive sur les lymphocytes T CD8. Néanmoins, l'IL2 qui agit sur les lymphocytes T CD8 est principalement produite par les lymphocytes T CD4. Les lymphocytes T CD8 peuvent également sécréter de l'IL4 et du GM-CSF.

b. Cytotoxicité

Un lymphocyte T CD8 effecteur est doué d'une activité cytotoxique à l'égard des cellules contre lesquelles il est commis. Les mécanismes de lyse qui induisent l'apoptose des cellules cibles sont principalement de deux types : le système perforine/granzyme et le système Fas/FasL. Le TNF produit lors de l'activation a également, dans une moindre mesure, une action cytotoxique.

- Perforine/granzyme

Le principal mécanisme d'action des cellules T cytotoxiques est la libération dépendante du calcium de granules lytiques suite à la reconnaissance d'une cellule présentant l'antigène. Ces granules contiennent au moins deux classes différentes de protéines : la perforine et les granzymes (Podack *et al.*, 1985; Pasternack *et al.*, 1986).

Le rôle de la perforine est central, puisque des souris déficientes en perforine ne sont plus capables de se protéger contre un certain nombre d'infections virales (Kagi *et al.*, 1994) et

deviennent plus sensibles aux progressions tumorales (van den Broek *et al.*, 1996). Dans des modèles *in vitro*, une perforine recombinante à forte dose est capable de lyser les cellules en se polymérisant et en formant des pores dans la bicouche lipidique induisant une instabilité osmotique et la mort de la cellule cible. A des doses plus physiologiques, la perforine n'est pas capable d'induire l'apoptose des cellules sans la présence de molécule de granzymes (Shi *et al.*, 1992).

Les granzymes sont des protéases. Il en existe plusieurs isoformes aux fonctions souvent redondantes (huit caractérisées chez la souris et cinq chez l'homme). Ceci explique pourquoi des souris déficientes en une des isoformes sont peu affectées (Heusel *et al.*, 1994; Ebnet *et al.*, 1995), bien que les molécules de granzyme soient les véritables effectrices de l'apoptose. Chez l'homme, ce sont surtout les molécules de granzyme A et B qui sont impliquées dans la cytotoxicité. Granzyme B active la caspase 3 par clivage, la caspase 3 clive l'inhibiteur ICAD (*Inhibitor of Caspase Activated Dnase*) permettant la libération de la caspase CAD qui est responsable de la fragmentation de l'ADN, et donc de l'apoptose. Granzyme A agit indépendamment de la voie des caspases (pour revue, (Lieberman, 2003)).

- Fas/FasL

La lyse d'une cellule cible par un lymphocyte T suite à l'engagement de Fas (CD95) a été mise en évidence plus tardivement. Différentes études avaient montré qu'un mécanisme ne nécessitant pas de Ca^{2+} et indépendant de perforine pouvait aboutir à la destruction d'une cellule cible (Ostergaard *et al.*, 1987; Helgason *et al.*, 1992). Rouvier *et al.* ont montré par la suite que c'était la molécule Fas qui était impliquée (Rouvier *et al.*, 1993). L'équipe de Nagata en clonant le FasL a montré qu'il était exprimé par les lymphocytes T activés et qu'il était responsable du mécanisme de lyse (Suda *et al.*, 1993; Suda *et al.*, 1995).

L'engagement du Fas sur une cellule cible par le FasL du lymphocyte T activé aboutit à la formation d'un complexe protéique appelé DISC (*Death Inducing Signalling Complex*) dans lequel la protéine adaptatrice FADD est recrutée (*Fas Associated Death Domain protein*). Ce recrutement s'effectue par l'interaction entre les DED (*Death-Effector Domain*) respectifs. FADD recrute et clive la procaspase 8 (FLICE) en caspase 8. Selon le type cellulaire, la caspase 8 a des effets différents. Dans les cellules de type I, la caspase 8 peut activer directement la caspase 3, qui est une des molécule effectrice principale de la mort cellulaire (clivage protéique, fragmentation de l'ADN). Dans les cellules de type II, la caspase 3 est activée par la voie mitochondriale : la caspase 8 clive BID, un membre de la famille pro-

apoptotique BCL-2, qui est alors transloqué à la membrane mitochondriale, en association avec Bax. Une fois insérés dans la membrane, BID et Bax favorisent la libération de cytochrome c, ce qui active la caspase 9. La caspase 9 active ensuite la caspase 3 ((Scaffidi *et al.*, 1998) et pour revue, (Krammer, 2000)).

La voie perforine/granzyme et la voie Fas ne sont pas utilisés uniformément. La voie perforine/granzyme semble prépondérante pour éliminer les cellules cibles alors que la voie Fas/FasL est plutôt impliquée dans la phase de contraction clonale (pour revue, (Brunner *et al.*, 2003)).

3. Contraction

Une fois que l'infection est sous contrôle du système immunitaire et qu'une grande partie des antigènes a été éliminée, la présence d'un grand nombre de lymphocytes activés devient superflue et éventuellement dangereuse.

La phase de contraction clonale est caractérisée par la mort de la plupart des lymphocytes T effecteurs et par le retour au repos de ceux qui restent. Ce processus dépend de nombreux paramètres, dont la vitesse d'élimination de l'agent pathogène, la présence de molécules de co-stimulation et les cytokines de l'environnement.

Les lymphocytes T perdus lors de la phase de contraction meurent par apoptose, selon un mécanisme appelé AICD (*Activation-Induced Cell Death*). Cette apoptose passe principalement par la voie Fas/FasL (Brunner *et al.*, 1995; Dhein *et al.*, 1995). Suite à l'activation, les lymphocytes expriment FasL et acquièrent la capacité de se détruire mutuellement (Alderson *et al.*, 1995; Ju *et al.*, 1995). Les lymphocytes T qui meurent par apoptose durant la phase de contraction se comportent plutôt comme des cellules de type I. L'apoptose des lymphocytes activés passe également par le récepteur p55 au TNF (CD102a ou TNF-R1) (Zheng *et al.*, 1995; Speiser *et al.*, 1996), ainsi que par TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*) (Jeremias *et al.*, 1998; Bosque *et al.*, 2005). Les voies de transduction du signal pour ces récepteurs (Fas, TNFR et TRAIL-R) appartenant tous à la superfamille du TNF se rejoignent.

De plus, l'IL2, durant cette phase de contraction joue un rôle actif pro-apoptotique (Van Parijs *et al.*, 1999).

Enfin, le manque de facteurs de survie comme les cytokines, qui ont été largement consommées durant la phase de prolifération active également les voies apoptotiques (pour revue, (Khaled *et al.*, 2002)).

4. Génération du répertoire mémoire

Les mécanismes qui gouvernent la constitution du répertoire mémoire restent largement inconnus. Deux hypothèses sont avancées : la génération d'un répertoire mémoire est soit un processus stochastique, où certains lymphocytes échappent à la mort de façon aléatoire, soit un processus déterminé par la nature qualitative ou quantitative des signaux reçus au cours de l'activation. Quoi qu'il en soit, des études chez la souris indiquent que la génération d'un répertoire mémoire est un processus déclenché dès le premier contact antigénique. De plus, la dose d'antigène n'est pas un élément déterminant (Kaech *et al.*, 2001; van Stipdonk *et al.*, 2001).

Même si les événements immunologiques gouvernant la génération du répertoire mémoire restent flous, les caractéristiques des cellules mémoires sont relativement bien connues.

Le répertoire mémoire est moins vaste que le répertoire naïf (Arstila *et al.*, 1999). Certaines études chez la souris suggèrent que le répertoire mémoire est plus affin (Busch *et al.*, 1999) tandis que d'autres indiquent que l'immunodominance maintenue dans le répertoire mémoire est représentée préférentiellement par des lymphocytes T susceptibles d'interagir avec plusieurs épitopes (Brehm *et al.*, 2002). Contrairement aux cellules naïves qui ne se divisent normalement pas, le maintien des lymphocytes T mémoires est la résultante d'un taux faible de prolifération associé à des signaux cytokiniques de survie. Cette survie est indépendante du CMH-peptide ; des lymphocytes T CD8 transférés à des souris classe I déficientes ($\beta 2m^{-/-}$) survivent très bien à long terme (Murali-Krishna *et al.*, 1999). Les cellules mémoires sont revenues au repos mais ont acquis la capacité de sécréter rapidement de l'IFN- γ et d'exercer une activité cytotoxique si elles sont ré-exposées à l'antigène. De plus, la ré-activation de cellules mémoires n'a plus besoin d'être aussi finement contrôlée que lors de l'activation primaire. C'est pourquoi, la présence de signaux de co-stimulation n'est pas aussi déterminante pour la mise en place d'une réponse efficace, même s'ils contribuent toujours à augmenter le niveau des réponses. Ainsi, la génération d'un répertoire mémoire permet une réponse plus rapide et plus intense (Pihlgren *et al.*, 1996; Zimmermann *et al.*, 1999).

Plusieurs modèles de différenciation des lymphocytes T naïfs en cellules effectrices et mémoires ont été proposés. Ces études reposent sur l'observation de sous-populations lymphocytaires mémoires ayant des caractéristiques différentes. Ces sous-populations sont définies sur la base de l'expression d'un ensemble de marqueurs phénotypiques, ainsi que sur l'étude de leurs capacités effectrices.

a. Les différents marqueurs et les différentes sous-populations

Différents marqueurs sont utilisés pour étudier la différenciation des lymphocytes T. On peut distinguer différentes catégories de marqueurs selon leur rôle. L'expression de ces marqueurs n'est pas toujours linéaire au cours des différentes phases d'activation et de différenciation.

Une catégorie de marqueurs utilisés sont des molécules d'adhérence : le CD62L est une sélectine et le CD49d (VLA A4), le CD49e (VLA A5), le CD18 (LFA-1), le CD58 (LFA-3) et le CD29 sont des intégrines. Le CCR7 est un récepteur de chémokines qui induit la migration des lymphocytes T vers les ganglions lymphatiques (Forster *et al.*, 1999).

Les marqueurs plus fréquemment utilisés sont : le CD45R, le CD62L, le CCR7, le CD27, le CD28, le CD127 (IL7R α).

Le CD45R est une phosphatase transmembranaire qui participe à la transduction activatrice du signal par le TCR (Trowbridge *et al.*, 1994). Le CD45R existe sous deux isoformes, CD45RO et RA qui sont issues d'un épissage alternatif (Streuli *et al.*, 1987). La forme RO semble la plus efficace pour la transduction du signal (Novak *et al.*, 1994).

Enfin, les marqueurs CD27 et CD28 sont des molécules de co-stimulation.

b. Classification des sous-populations lymphocytaires

Les premières classifications décrites ne tenaient pas compte des spécificités antigéniques et ont analysé l'ensemble des CD8.

Une description des différentes sous-populations lymphocytaires T CD8 mémoires dans le sang périphérique a été faite par Hamann *et al.*. Cette classification est basée sur l'expression des marqueurs CD45RA et CD27 en association avec des molécules d'adhérence (CD62L et intégrines CD49d, CD49e, CD18, CD29), d'activation ou de co-stimulation (CD27 et CD28). Cette étude est complétée par la description des capacités fonctionnelles des différentes sous-populations (Hamann *et al.*, 1997) (fig. 6). Trente donneurs ont été analysés, ce qui permet d'estimer la représentation de chaque sous-population. Ainsi, dans le sang périphérique,

environ la moitié des cellules est naïve (**CD45RA+/CD45RO-/CD27+/CD28+**) et n'a donc pas de fonction effectrice. Environ un tiers des cellules sont **CD45RA-**, avec une expression hétérogène du CD27 (seule 4% des cellules totales sont **CD45RA-/CD27-**). L'hétérogénéité du CD27 est associée à l'hétérogénéité du CD28 : celles qui sont **CD27+** sont **CD28+** à 100%, alors que celles qui sont **CD27-** sont **CD28-** à 50%. Ce sont des cellules mémoires qui expriment des faibles taux de CD62L « remplacé » par l'expression de certaines intégrines, ce qui illustre leur migration préférentielle vers les organes périphériques au détriment des ganglions lymphatiques (pour revue, (von Andrian *et al.*, 2000)). Ces cellules sont caractérisées par leur capacité à sécréter un vaste ensemble de cytokines (IL2, IFN- γ , TNF- α et IL4). Enfin, 13% des cellules sont **CD45RA+/CD27-/CD28-**. Ce sont également des cellules mémoires, qui produisent principalement de l'IFN- γ et du TNF- α , pour lesquelles les cytokines exogènes (IL2 ou IL15) sont nécessaires à la prolifération mais qui sont très cytotoxiques (Hamann *et al.*, 1997).

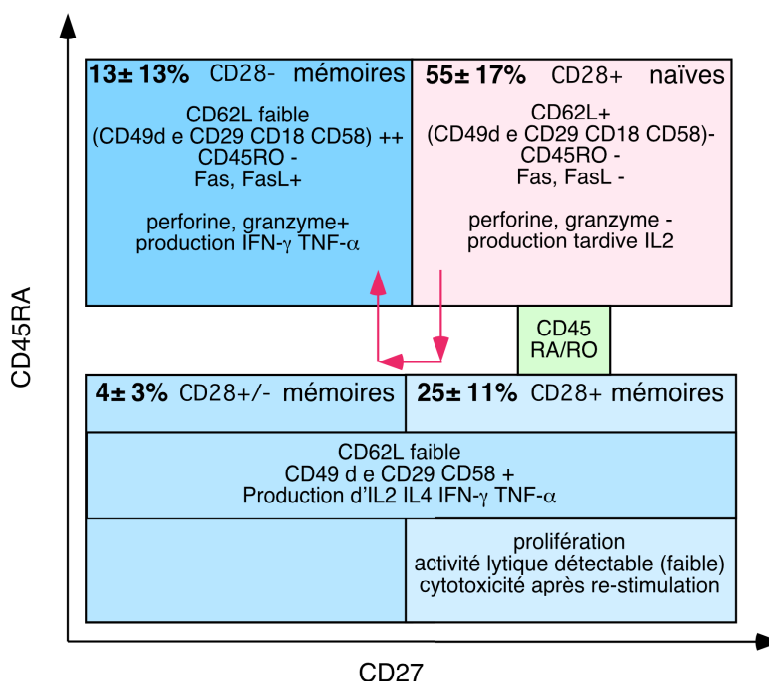


Figure 6. Modèle de différenciation selon l'expression des marqueurs CD45RA et CD27 (selon (Hamann *et al.*, 1997)). Les flèches représentent l'évolution d'un statut naïf vers un statut mémoire de plus en plus différencié.

Sur la base de l'expression du CD45RA, du CCR7 et du CD62L, Sallusto *et al.* ont décrit l'existence de 4 sous-populations T CD8 : les **CD45RA+/CCR7+/CD62L+** qui sont des cellules naïves, les **CD45RA-/CCR7+/CD62L+** qui sécrètent de l'IL2 mais pas d'IFN- γ les **CD45RA-/CCR7-/CD62L-** qui sécrètent de l'IFN- γ et de l'IL2 dans une moindre mesure et

les **CD45RA+/CCR7-/CD62L-** qui ne sécrètent presque plus d'IFN- γ (Sallusto *et al.*, 1999)□□□.7.

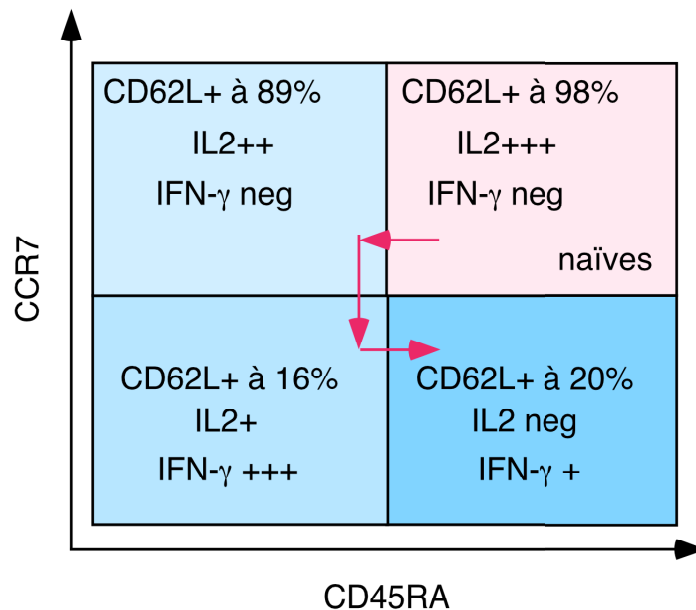


Figure 7. Modèle de différenciation des lymphocytes T CD8 selon l'expression des marqueurs CD45RA, CCR7 et CD62L (selon (Sallusto *et al.*, 1999)). Les flèches représentent l'évolution d'un statut naïf vers un statut mémoire de plus en plus différencié.

Bien que la suite de l'étude concerne les lymphocytes T CD4, il me semble important de la mentionner, puisque la classification proposée est largement utilisée comme référence. Au sein de la population CD4, les auteurs ont dénommé les CD45RA-/CCR7+/CD62L+ les lymphocytes mémoires centraux (**T_{CM}**) et les CD45RA-/CCR7-/CD62L- les lymphocytes effecteurs mémoires (**T_{EM}**). Ils proposent que les **T_{EM}** soient les cellules effectrices principales localisées dans les tissus périphériques, au plus proche des sites de réinfection potentiels. Les **T_{CM}** représenteraient une sous-population mémoire principalement localisée dans les organes lymphoïdes secondaires et dépourvue d'activité effectrice véritable, mais capable par une grande capacité proliférative de régénérer les stocks de **T_{EM}** (Sallusto *et al.*, 1999).

L'équipe de Ahmed, dans un modèle de souris transgéniques a proposé un modèle inverse - les **T_{EM}** étant pour eux moins efficaces en terme de protection et capables de se différencier en **T_{CM}** (Wherry *et al.*, 2003).

Cependant, au sein de la population CD8, cette distinction n'est peut-être pas aussi formelle. Unsoeld *et al.*, chez la souris, ont montré que suite à une stimulation antigénique, les deux sous-populations CCR7+ et CCR7- étaient capables de sécréter de l'IFN- γ et de lyser des cellules cibles de manière aussi efficace (Unsoeld *et al.*, 2002). Ravkov *et al.*, en analysant les lymphocytes T CD8 dirigés contre différents épitopes de l'EBV, du CMV et de la grippe chez

l'homme ont montré que selon l'antigène considéré, il y avait des différences d'expression du CCR7. Néanmoins, toutes sont capables de répondre efficacement à une stimulation antigénique par une sécrétion d'IFN- γ et elles contiennent des taux équivalents de perforine (Ravkov *et al.*, 2003).

Cette dernière étude illustre l'intérêt des analyses qui prennent en considération les spécificités antigéniques des populations, rendues possible par le développement de la technologie tétramère HLA-peptide (Altman *et al.*, 1996; Bodinier *et al.*, 2000). Appay *et al.* ont proposé un schéma de différenciation des lymphocytes T CD8 suite à l'étude du phénotype des lymphocytes T spécifiques d'épitopes issus d'antigènes de l'EBV, du CMV, du HIV et du HCV (Appay *et al.*, 2002a) (fig. 8). Ainsi, ils montrent que selon l'antigène considéré, les cellules mémoires spécifiques ne présentent pas des phénotypes identiques. Leur analyse rejoint celle de Hamann *et al.*, puisqu'ils proposent qu'au cours de la différenciation, les cellules passent d'un stade de meilleure capacité proliférative (molécules de co-stimulation+, perforine faible) à un stade de meilleure fonction cytotoxique (perforine fort et granzyme+). L'évolution progressive entre ces deux populations s'accompagne de changement phénotypique des marqueurs CD28 et CD27. Les cellules spécifiques sont d'abord **CD28+CD27+** (précoce), puis **CD28-CD27+** (intermédiaire) puis **CD28-CD27-** (tardives).

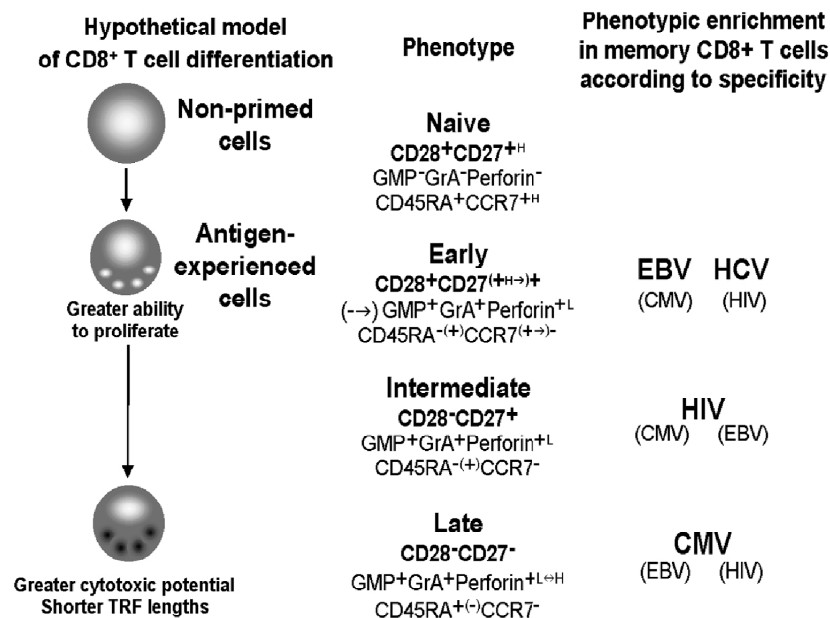


Figure 8. Analyse phénotypique des lymphocytes T selon l'antigène considéré, classification de Appay *et al* (Appay *et al.*, 2002a).

Les cellules constituant le répertoire mémoire n'ont donc pas les mêmes caractéristiques phénotypiques selon l'antigène considéré, en particulier, la persistance de l'antigène dans le cas des infections chroniques et latentes influence la composition du répertoire mémoire. De plus, le répertoire dirigé contre un épitope donné n'est pas constitué de cellules ayant un phénotype homogène. Chez l'homme, les lymphocytes T CD8 dirigés contre les principaux épitopes antigéniques des virus du CMV et de l'EBV ont été particulièrement étudiés, et illustrent bien l'hétérogénéité du répertoire mémoire.

c. Différenciation des lymphocytes T CD8 anti-EBV et anti-CMV

- Primo-infection

Durant la phase aiguë de l'infection, quel que soit la nature de l'antigène ciblé, le phénotype des cellules activées semble globalement assez homogène (relativement peu d'études sont disponibles chez l'homme). Les cellules activées sont HLA DR+, CD38+, Ki67+ (intracellulaire) et perdent l'expression du CD62L (Callan *et al.*, 1998). La majorité des cellules expriment le CD45RO, mais pas le CD45RA. Seule une très faible minorité exprime le CCR7, indiquant que la diminution d'expression de ce récepteur est un événement précoce (Appay *et al.*, 2002a; Urbani *et al.*, 2002)). Au cours de la primo-infection, une proportion non négligeable de lymphocytes T activés expriment le CD28, mais le CD28 est ensuite progressivement perdu au fur et à mesure de la progression de l'infection, en particulier dans le cas du CMV (Callan *et al.*, 1998; Gamadia *et al.*, 2003). Le CD27 est perdu transitoirement, mais plutôt tardivement après le début de l'infection (Appay *et al.*, 2002b). Les lymphocytes contiennent des vésicules de perforine à un niveau intermédiaire (Appay *et al.*, 2002a).

- Réactivation

- Lymphocytes T CD8 anti-EBV

Une analyse détaillée des différentes populations T CD8 en réponse à l'EBV 60 mois après la primo-infection a montré qu'il y avait des différences phénotypiques associées à la nature de l'épitope (latent ou lytique). Les populations spécifiques d'épitopes **latents** sont totalement CD45RO+, plutôt CCR7+, CD27+, CD28+ et hétérogène pour le CD62L. Les lymphocytes spécifiques d'épitopes **lytiques** sont principalement CD45RO+, mais une partie d'entre eux,

variable selon les individus est CD45RA⁺. Ils sont CCR7⁻, CD27⁺, et hétérogènes pour le CD28 et le CD62L (Hislop *et al.*, 2001; Catalina *et al.*, 2002; Hislop *et al.*, 2002). La différence de statut du CCR7 est confirmée par Ravkov *et al.* (Ravkov *et al.*, 2003). Cela ne semble pas avoir de conséquences fonctionnelles majeures puisque toutes les cellules sont susceptibles de sécréter de l'IFN- γ , du TNF- α et d'exercer une activité cytotoxique en réponse à l'antigène (Hislop *et al.*, 2001).

– Lymphocytes T CD8 anti-CMV

Les lymphocytes T dirigés contre l'épitope antigénique pp65 issu du CMV sont les plus étudiés ; cet épitope est celui contre lequel la majorité des individus génère une réponse T CD8 (Kern *et al.*, 2002).

L'étude la plus précise a été menée par Appay *et al.*. Ils montrent que chez un même donneur, les cellules spécifiques sont de deux types : une minorité de CD45RA⁻, CD27⁺, CD28⁻, CCR7⁻, perforine intermédiaire, granzyme A + et une majorité de CD45RA⁺, CD27⁻, CD28⁻, CCR7⁻, perforine intermédiaire/élevé, granzyme A⁺. Sur plusieurs donneurs, ils montrent que les cellules spécifiques de l'épitope pp65 sont globalement CD27⁻CD28⁻ et sont cytotoxiques (Appay *et al.*, 2002a). L'absence de CCR7 est confirmée par toutes les autres analyses. Le statut majoritairement CD27⁻, bien qu'hétérogène selon les individus, est confirmé par l'équipe de van Lier et par Sandberg *et al.* Gamadia *et al.* montrent également que le phénotype CD45RA⁺CD27⁻ est associé à une plus forte expression de granzyme (Gamadia *et al.*, 2001; Sandberg *et al.*, 2001; van Leeuwen *et al.*, 2002).

Les cellules anti-CMV et anti-EBV n'expriment pas les marqueurs de migration lymphoïde CCR7 et CD62L (Chen *et al.*, 2001). La ré-expression du CCR7 par des cellules mémoires pourrait être associée aux antigènes qui persistent moins ou pas dans l'organisme, conférant aux cellules les moins sollicitées la capacité de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (par exemple, les lymphocytes dirigés contre des épitopes du virus de la grippe, en dehors d'un épisode infectieux sont plutôt CCR7⁺) (Ravkov *et al.*, 2003).

- Les lymphocytes T mémoires CD45RA⁺

Les lymphocytes T mémoires CD45RA⁺ ont fait l'objet de nombreuses études. Le phénotype associé est généralement CD27⁻/CCR7⁻/CD28⁻. Certains les considèrent comme des effecteurs tardifs en fin de différenciation qui présenteraient un potentiel prolifératif diminué et une capacité cytotoxique augmentée (Appay *et al.*, 2002a). Cet état de différenciation est en

accord avec l'observation que les cellules CD28⁻ ont des télomères plus courts, probablement associés à un nombre de divisions plus important (Monteiro *et al.*, 1996). Champagne *et al.*, ont montré que les lymphocytes T CD45RA⁺ CCR7⁻ prolifèrent peu à une stimulation par de l'anti-CD3 et de l'anti-CD28 (Champagne *et al.*, 2001). D'autres études ont cependant montré que les lymphocytes spécifiques de pp65 CD45RA⁺ étaient capables de se diviser (Sandberg *et al.*, 2001; van Leeuwen *et al.*, 2002; Wills *et al.*, 2002). Sandberg *et al.* n'ont pas analysé l'expression du CCR7 et pour van Leeuwen *et al.*, les divisions sont associées à une conversion du CD45RA en CD45RO, (bien que cette démonstration ne soit pas formelle ; cette conversion peut en fait refléter des capacités de prolifération différentes des sous-populations). Dans ces deux études, les lymphocytes sont capables de sécréter de l'IFN- γ , mais seulement une faible proportion d'entre eux (environ 15%) sécrète de l'IL2. De manière assez surprenante, Kuijpers *et al.* décrivent l'existence d'une sous-population spécifique de pp65 CD45RA⁺CD27⁻ dès la primo-infection sur une cohorte de 220 enfants (Kuijpers *et al.*, 2003), ce qui suppose que soit ces cellules se différencient très rapidement, soit qu'elles sont issues de cellules naïves différentes. Dunne *et al.* ont montré que les lymphocytes T anti-BZLF-1 de l'EBV CD45RA⁺ étaient d'une part capables de proliférer et d'exercer une activité cytotoxique et qu'ils étaient d'autre part plus résistants à l'apoptose avec des taux de Bcl-2 plus élevés comparés à ceux des cellules CD45RA⁻ (Dunne *et al.*, 2002).

Il semble donc que les lymphocytes T dirigés contre l'épitope pp65 soient plus avancés dans le processus de différenciation que les lymphocytes T dirigés contre les épitopes lytiques puis latents de l'EBV. Il n'y a pas pour l'instant d'éléments formels pour expliquer cette différence, mais plusieurs paramètres semblent impliqués: i) la nature du premier contact entre la DC et le lymphocyte T naïf, ii) la fréquence de la réactivation virale et iii) le tropisme cellulaire des virus (pour revue, (van Lier *et al.*, 2003)).

d. Lymphocytes TCD8 spécifiques d'antigènes exprimés par le mélanome

De nombreux antigènes de mélanome ont été caractérisés. Selon leur expression, ils peuvent être classifiés en deux groupes : les antigènes de différenciation et les antigènes spécifiques de tumeur. Les antigènes de différenciation regroupent les antigènes comme gp100, Melan-A/MART-1 ou tyrosinase. Les antigènes spécifiques de tumeur appartiennent soit au groupe « cancer testis », comme NY-ESO et les antigènes des familles MAGE et LAGE soit sont des antigènes mutés ou d'expression aberrante (NA17-A) (pour revue, (Boon *et al.*, 1996)).

- Individu sain

Chez une proportion non négligeable d'individus non porteurs de mélanome (sept sur dix), il a été décrit la présence dans le sang périphérique de lymphocytes T CD8 dirigés contre un épitope de Melan-A/MART-1, mais à des fréquences faibles. L'analyse phénotypique et fonctionnelle de ces cellules révèle qu'elles sont CD45RA+, CD28+, CCR7+, ne sécrètent pas d'IFN- γ mais deviennent lytiques une fois triées et amplifiées *in vitro*. Elles sont considérées comme étant des cellules naïves (Pittet *et al.*, 1999; Pittet *et al.*, 2001a). Le phénotype CCR7+CD45RA+ a été confirmé chez un donneur sain dans une autre étude (Mallard *et al.*, 2004).

- Individu porteur de mélanome

Chez les individus porteurs de mélanome, la présence, spontanée ou induite par des vaccinations actives (injection de peptides ou de DC chargées), de lymphocytes T spécifiques d'antigène de tumeurs a été documentée dans de nombreuses études (Lee *et al.*, 1999; Valmori *et al.*, 2000; Pittet *et al.*, 2001b; Yamshchikov *et al.*, 2001). Des analyses phénotypiques et fonctionnelles précises peuvent apporter des réponses à deux types de questions: quelles sont les caractéristiques des cellules en dehors de tout contexte thérapeutique, et quelles sont les réponses qui peuvent être générées *in vivo* suite à des vaccinations actives ?

- Présence naturelle

En dehors de tout traitement, les lymphocytes T spécifiques trouvés dans le sang périphérique ou dans les ganglions ne semblent pas toujours effecteurs. Dans le sang périphérique, seule une partie des patients est capable de générer des lymphocytes T effecteurs anti-Melan-A cytotoxiques. Ils sont CD45RA+/CCR7-/CD27-/CD28- perforine+ granzyme+ et sécrètent de l'IFN- γ (Valmori *et al.*, 2002). Chez les autres patients, soit il n'est pas détecté de lymphocytes T spécifiques, soit ils ont un phénotype naïf (CCR7+/CD45RA+, non cytotoxique) (Anichini *et al.*, 1999; Dunbar *et al.*, 2000). Lee *et al.* ont montré en étudiant les lymphocytes T spécifiques de tyrosinase retrouvés à une forte fréquence chez un patient que ces cellules étaient anergiques (présence de perforine, mais pas de sécrétion de TNF- α et d'IFN- γ) (Lee *et al.*, 1999).

L'analyse des lymphocytes présents dans les ganglions envahis par la tumeur révèle que seulement une minorité de ganglions contient des lymphocytes de phénotype mémoire/effecteur (CD45RA-/CCR7-/CD27+/CD28+perforine+), la majorité contenant des lymphocytes ayant un phénotype naïf (CD45RA+/CCR7+/CD27+/CD28+perforine-) (Mortarini *et al.*, 2003). Anichini *et al.*, en étudiant l'expression des marqueurs CCR7 et CD45 sur un grand nombre de ganglions envahis montrent des résultats similaires (Anichini *et al.*, 2003).

– Lymphocytes T potentiellement induits par une immunothérapie

Suite à des vaccinations actives, il est fréquemment décrit des augmentations de fréquence de lymphocytes T spécifiques d'antigènes de tumeur dans le sang périphérique (Nestle *et al.*, 1998; Rosenberg *et al.*, 1998; Pittet *et al.*, 2001a; Paczesny *et al.*, 2004). Il a été caractérisé des cellules anti-gp100 présentant un phénotype CD45RA- ou faible, CCR7-, qui sécrètent de l'IFN- γ (Chiong *et al.*, 2004), mais il semble que les cellules générées ne soient pas toujours effectrices (Speiser *et al.*, 2002). Dans une étude portant sur treize patients vaccinés par un peptide issu de gp100, 73% des lymphocytes T générés ont un phénotype effecteur sur la base des marqueurs CD45RA et CD27, mais seulement 17% contiennent de la perforine (qui peut cependant être induite par restimulation *ex vivo*) (Monsurro *et al.*, 2002).

L'équipe de Rosenberg a mené une étude phénotypique approfondie sur le devenir *in vivo* des lymphocytes T amplifiés à partir de tumeur et réinjectés à six patients (ayant reçu un traitement immunosuppresseur) qui ont répondu au traitement (Dudley *et al.*, 2002). A l'issue de l'amplification, les lymphocytes spécifiques sont principalement CD45RA-/CD45RO+/CCR7-/CD27-/CD28 \pm /CD62L-/CD127(IL7R α)-/IL15R α -. Dès la première semaine après l'injection, et de manière stable jusqu'à deux mois après, les auteurs montrent une évolution globale vers un phénotype plutôt CD27+CD28+ chez les six patients, stade réputé pourtant plus précoce dans le processus de différenciation. Le CD127 est également augmenté, le CD45RA est réexprimé massivement sans que le CD45RO soit perdu. Le CCR7 et le CD62L restent négatifs (Powell *et al.*, 2005).

C. Rôle des cytokines dans l'activation T CD8

1. Famille γ_c : caractéristiques biochimiques

Le déroulement de la réponse T est en grande partie contrôlé par des cytokines (Schluns *et al.*, 2003).

La famille de cytokine la plus impliquée est représentée notamment par l'IL2, l'IL4, l'IL7, l'IL9, l'IL13, l'IL15 et l'IL21. Les récepteurs des cytokines de cette famille sont caractérisés par l'utilisation de la même chaîne γ (γ_c ou CD132), ce qui implique des voies communes de transduction du signal. Des mutations dans cette chaîne sont à l'origine de syndromes sévères d'immunodéficiences, comme le X-linked SCID (*Severe Combined ImmunoDeficiency*), illustrant le rôle primordial de ces cytokines dans l'activation T. La phosphorylation de la chaîne γ par la Janus kinase 3 (JAK) (Lin *et al.*, 1995) permet le recrutement de protéines à domaine SH2 comme STAT5 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) qui augmente la survie cellulaire en induisant la transcription de Bcl-2. La phosphorylation de la chaîne γ par les JAK permet aussi l'activation des voies de survie passant par PI3K et Akt (pour revue, (Plas *et al.*, 2002)).

Ces cytokines, et principalement l'IL2, l'IL7 et l'IL15 agissent comme facteurs de croissance et de survie pour les lymphocytes T CD8 tout au long de leur processus d'activation et de différenciation. La modulation de leur activité vient de leur deuxième ou troisième chaîne de leur récepteur qui est différente (fig. 9). L'IL7 est constituée de deux sous-unités (γ_c et IL7R α ou CD127). L'IL2 et l'IL15 sont constituées de trois chaînes : γ_c , chaîne β commune (IL2/IL15R β ou CD122), et une chaîne α propre : IL15R α et IL2R α (CD25). La chaîne β est phosphorylée par JAK1 et recrute STAT3. Le CD25, avec une portion intracytoplasmique très courte (13aa) ne participe pas à la transduction du signal et la chaîne α du récepteur à l'IL15 se fixe à TRAF2 (*Tumor necrosis factor-TNF Receptor-Associated Factor*). TRAF2 est également impliqué dans l'apoptose induite par le TNF, et quand il est séquestré par l'IL15, cette apoptose est inhibée (Bulfone-Pau *et al.*, 1999).

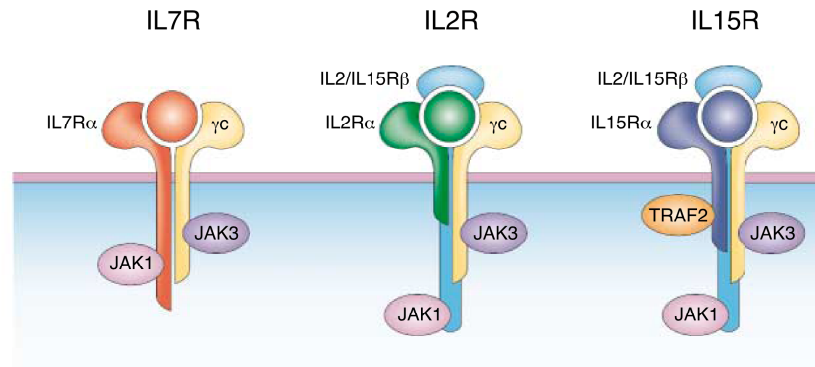


Figure 9. Schéma des récepteurs à l'IL7, l'IL2 et l'IL15 (Schluns *et al.*, 2003).

Un complexe composé de l'IL2/15R β et γ_c possède une affinité intermédiaire pour l'IL2 et l'IL15 ($K_a=10^9$). L'IL2 s'associe à la chaîne α de son récepteur seul avec une faible affinité ($K_a=10^8$), mais quand le récepteur est formé de ses 3 unités, l'affinité est alors très augmentée ($K_a=10^{11}$). L'IL15 a d'emblée une forte affinité ($K_a=10^{11}$) pour la chaîne α de son récepteur (Greene *et al.*, 1985; Smith, 1988; Giri *et al.*, 1994).

2. Rôles biologiques des principales cytokines de la famille γ_c

a. IL7

L'IL7 est la cytokine la plus impliquée dans le contrôle de la lymphopoïèse thymique où elle joue un rôle de facteur de croissance et de survie vraisemblablement en augmentant les taux de Bcl-2 (von Freeden-Jeffry *et al.*, 1997).

Les cellules naïves expriment l'IL7R α , l'IL15R α , l'IL2/IL15R β et la chaîne γ_c , mais pas le CD25, elles répondent donc mal à l'IL2 (fig. 10). C'est principalement l'IL7 qui a un rôle dans le maintien en survie des lymphocytes T naïfs avant la rencontre avec l'antigène (homéostasie). L'IL7 est produite par le tissu stromal de la moelle osseuse, les cellules thymiques intraépithéliales et par les cellules de l'épithélium intestinal (Marrack *et al.*, 2000). Chez la souris, le rôle de l'IL7 dans survie des lymphocytes T CD8 naïfs a été montré *in vivo* (Schluns *et al.*, 2000), *in vitro* (Tan *et al.*, 2001) et a été confirmé chez le macaque (Moniuszko *et al.*, 2004). L'IL7 permet une prolifération des cellules T naïves injectées à des souris déficientes en lymphocytes T (RAG $^{-/-}$). Suite à l'activation, l'IL2 commence à être produite et joue un rôle négatif sur l'expression de l'IL7R α (Xue *et al.*, 2002), qui ne sera ré-exprimé qu'à la fin de la phase d'activation, sur une partie des cellules, quand elles reviennent

au repos (Li *et al.*, 2003a)(étude sur des CD4). L'IL7 n'a donc pas de rôle particulier dans le contrôle des phases de prolifération et de la contraction clonale, mais, comme l'IL15, elle joue un rôle important de survie à long terme des lymphocytes T mémoires (pour revue, (Bradley *et al.*, 2005)). A ce titre, l'IL7 est utilisée dans des protocoles cliniques en tant qu'adjuvant d'immunothérapie par vaccination avec des cellules tumorales dans le mélanome (Wittig *et al.*, 2001; Carsana *et al.*, 2002).

La ré-expression de l'IL7R α définit une sous-population de cellules mémoires capables de survivre à long terme, exprimant des niveaux plus importants de Bcl-2, et proliférant plus intensément que leurs homologues IL7R α - (Kaech *et al.*, 2003; van Leeuwen *et al.*, 2005) (fig. 10). Ceci suggère que les cellules IL7R α + seraient des cellules mémoires à long terme. Madakamutil *et al.* ont montré que l'expression du CD8 α/α était préférentielle sur les cellules mémoires à long terme, et qu'une des conséquences de cette expression était l'augmentation de l'IL7R α (Madakamutil *et al.*, 2004). Ainsi, le CD8 α/α et l'IL7R α pourraient s'avérer être des marqueurs informatifs sur le statut mémoire d'une population.

Cependant, la ré-expression de l'IL7R α est variable selon le virus concerné : quand il y a persistance de l'antigène, comme dans le cas des infections par le CMV ou l'EBV, la ré-expression serait quasiment nulle, alors que quand les virus sont complètement éliminés (virus de la grippe), il y a une ré-expression significative (van Leeuwen *et al.*, 2005). Des résultats similaires ont été documentés chez la souris (Wherry *et al.*, 2004). L'équipe de Zinkernagel a montré que la persistance de l'antigène empêchait la ré-expression de l'IL7R α (Lang *et al.*, 2005). Cette absence de ré-expression de l'IL7R α a également été documentée sur les lymphocytes T des patients infectés par le VIH (Paiardini *et al.*, 2005).

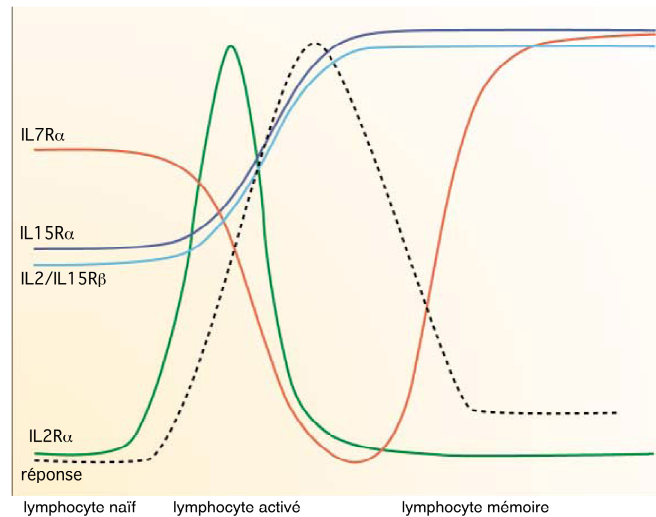


Figure 10. Evolution de l'expression des récepteurs aux cytokines IL2, IL7 et l'IL15 au cours de la réponse T (Schluns *et al.*, 2003).

b. IL2

L'IL2 a d'abord été caractérisée comme étant un facteur prolifératif des lymphocytes T (TCGF *T Cell Growth Factor*). C'est la cytokine la plus largement utilisée dans les cultures *in vitro* de lymphocytes T et elle joue un rôle double dans le contrôle de l'activation T. Elle n'est produite que par les lymphocytes T activés.

Le récepteur de haute affinité de l'IL2 (nécessitant le CD25) n'est pas exprimé par les cellules naïves (fig. 10). En début d'activation, la production d'IL2 par les lymphocytes T débute rapidement et il y a induction de l'expression du CD25. Les lymphocytes T activés répondent donc très bien à cette cytokine qui peut agir de manière autocrine (Smith, 1988). Durant la phase de prolifération, l'IL2 est un facteur de survie et de prolifération primordial (Van Parijs *et al.*, 1999). Durant la phase de contraction, l'IL2 joue un rôle central dans l'AICD et dans l'apoptose induite par FasL. Cet aspect a été largement documenté pour les lymphocytes T CD4 (Lenardo, 1996; Refaeli *et al.*, 1998). Les expériences menées chez des souris déficientes en IL2 ne permettent pas toujours de mettre en évidence des défauts d'activation, peut-être du fait des fonctions redondantes exercées par les autres cytokines (Schorle *et al.*, 1991; Kundig *et al.*, 1993). En effet, chez des souris déficientes en IL2R α il est observé une expansion polyclonale de lymphocytes T suite à une infection, associée à des phénomènes auto-immuns, ce qui suggère que l'absence d'IL2 induit la prolifération des cellules potentiellement auto-réactives en empêchant leur apoptose (Willerford *et al.*, 1995).

c. IL15

L'IL15 est produite principalement par les monocytes (Bamford *et al.*, 1996), par les DC (Blauvelt *et al.*, 1996) et par les cellules stromales de la moelle osseuse (Ohteki *et al.*, 1998). Elle joue un rôle majeur sur le développement et l'activation des lymphocytes T CD8 et des NK.

Comme l'IL7, l'IL15 est impliquée dans l'homéostasie des lymphocytes T naïfs (Schonland *et al.*, 2003) et les souris déficientes en IL15 ou en IL15R α ont environ deux fois moins de lymphocytes T CD8 naïfs que les souris normales (Lodolce *et al.*, 1998). Durant la phase d'initiation de la réponse, l'IL15 favorise la maturation des DC (Ohteki *et al.*, 2001), ce qui intervient indirectement sur l'activation T. Une étude *in vitro* sur des PBMC humains a montré que les cellules naïves sont capables de répondre de manière antigène indépendante à l'IL15 par l'acquisition d'un phénotype effecteur, caractérisé par une diminution d'expression du CD28 (Alves *et al.*, 2003).

La surexpression d'IL15 inhibe spécifiquement l'apoptose dépendante de l'IL2 (Marks-Konczalik *et al.*, 2000) en inhibant la voie Fas (Mueller *et al.*, 2003).

L'effet principal de l'IL15 sur l'activation T concerne l'homéostasie des cellules T mémoires et leur survie à long terme (Becker *et al.*, 2002; Judge *et al.*, 2002; Villinger *et al.*, 2004). Alors que l'IL7 semble avoir plutôt un rôle de survie stricte, l'IL15 participe à l'homéostasie en permettant une prolifération basale des cellules mémoires en l'absence de signal antigénique (Goldrath *et al.*, 2002). L'IL15 a alors un rôle opposé à celui de l'IL2, qui semble plutôt inhiber cette survie à long terme (Ku *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001). La prolifération clonale observée chez les souris déficientes en IL2R α ne se produit pas chez des souris déficientes en IL15R α , qui sont plutôt lymphopéniques (Lodolce *et al.*, 1998). De la même manière, des souris déficientes en IL15 ont un nombre diminué de cellules mémoires (et surtout une absence de cellules NK) et ne sont pas capables de générer une réponse protectrice contre les infections (Kennedy *et al.*, 2000). Un mécanisme potentiel responsable du rôle essentiel de l'IL15 dans la survie à long terme des lymphocytes T mémoires est que cette cytokine active les télomérases des lymphocytes T (Weng *et al.*, 1996), permettant ainsi de minimiser la perte des télomères au fur et à mesure des divisions successives (Li *et al.*, 2005). Une étude suggère une corrélation entre un fort niveau d'expression de l'IL15R α et une forte avidité des clones T, qui auraient donc un avantage prolifératif en présence d'IL15 (Oh *et al.*, 2004).

Actuellement l'IL15 recombinante fait l'objet d'études chez la souris en tant d'adjuvant d'immunothérapie par vaccination avec des cellules tumorales (Melchionda *et al.*, 2005) ou par injection de TIL (Roychowdhury *et al.*, 2004). Dans ces deux publications, il a été montré une augmentation de la durée de vie des animaux traités. Des essais d'administration d'IL15 *in vivo* sont également réalisés chez le macaque dans un modèle d'infection par le VIH. (Mueller *et al.*, 2005). Une autre étude a montré que l'administration d'IL15 suite à une greffe allogénique de moelle osseuse chez des souris déplétées en cellules T accélérât la reconstitution du système immunitaire à partir des cellules du donneur (T CD8 et NK), associée à une augmentation du risque de GvH (Alpdogan *et al.*, 2005). Le rôle critique de l'IL15 présent dans le greffon dans la survenue d'une GvH a été confirmé dans une autre étude murine (Blaser *et al.*, 2005).

d. IL21

L'IL21 est une cytokine nouvellement identifiée, sécrétée par les lymphocytes T CD4 activés (Parrish-Novak *et al.*, 2000). Le récepteur à l'IL21 est constitué d'une chaîne propre, l'IL21R α , qui présente des homologies avec l'IL2/IL15R β , et de la chaîne commune γ_c (Asao *et al.*, 2001). L'IL21 a des effets pléiotropiques, influençant le versant humoral et cellulaire de la réponse immunitaire, régulant la maturation des DC (Brandt *et al.*, 2003), les fonctions des NK (Kasaian *et al.*, 2002).

L'IL21 agit comme cytokine de co-stimulation, puisqu'elle augmente la prolifération de lymphocytes T induite par de l'anti-CD3 (Parrish-Novak *et al.*, 2000), mais elle ne semble pas indispensable car des lymphocytes T issus de souris déficientes pour l'IL12R α prolifèrent normalement (Ozaki *et al.*, 2002). Des études utilisant de l'IL21 recombinante ou des souris IL21R $^{-/-}$ ont permis de montrer que l'IL21, en synergie avec l'IL15 et l'IL7 augmente les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8 et en particulier la sécrétion d'IFN- γ (Strengell *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2005). La capacité de l'IL21 à augmenter les réponses T CD8 a également été documentée dans des modèles tumoraux : l'injection des lignées de mélanome sécrétant de l'IL21 permet une régression des tumeurs, associée à une activation des NK et des CD8 (Ma *et al.*, 2003). En l'absence de signal antigénique, et donc en situation de maintien de l'homéostasie, l'IL21, contrairement à l'IL7 ou l'IL15, ne fournit pas de signal mitogénique aux lymphocytes T naïfs, mais permettrait de maintenir l'expression du CD28 à la surface des lymphocytes T CD8 cultivés en présence d'IL15 (Alves *et al.*, 2005).

D. Rôle des molécules accessoires dans l'activation T CD8

Bien que cette distinction soit un peu formelle, les molécules accessoires sont divisées en deux catégories : les **molécules d'adhérence**, qui participent au renforcement des interactions entre la cellule présentatrice d'antigène et le lymphocyte T, et des **molécules de co-stimulation**, qui transduisent un co-signal d'activation.

1. Molécules d'adhérence

Selon leur structure, les molécules d'adhérence sont principalement regroupées dans 3 familles différentes : les sélectines, les intégrines et la famille des immunoglobulines. Les molécules d'adhérence remplissent différents rôles au cours de l'initiation de la réponse immunitaire : elles participent à la migration des lymphocytes vers les ganglions lymphatiques ; elles constituent les premières molécules d'interactions entre les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes T ; elles renforcent l'interaction entre les deux cellules, puis participent à la co-stimulation des lymphocytes.

a. Migration vers les ganglions lymphatiques

Les sélectines sont des glycoprotéines membranaires possédant un domaine semblable à une lectine capable de lier des motifs sucrés. La L-sélectine, ou CD62L est fortement exprimée par les cellules T naïves, et son expression est diminuée après l'activation. Elle reconnaît des motifs glycosylés portés par les endothéliums vasculaires (Springer *et al.*, 1991). Le CD62L est impliqué dans le recrutement des lymphocytes aux organes lymphoïdes (*homing*) mais ne permet pas le passage des cellules à travers la barrière endothéliale (Kannagi, 2002). Pour que cela soit possible, il faut l'intervention d'intégrines qui ont des affinités plus fortes pour leur ligand que les sélectines pour les motifs sucrés.

Les intégrines sont des hétérodimères portant une chaîne β qui définit la classe de l'intégrine et une chaîne α . LFA-1 est une $\beta 2$ intégrine exprimée par tous les lymphocytes T, qui se lie à ICAM-1, ICAM-2 et ICAM-3 (*IntraCellular Adhesion Molecule*). Les ICAM appartiennent à la superfamille des immunoglobulines.

Le CCR7 est un récepteur de chimiokines exprimé par les lymphocytes T naïfs. Son ligand principal est une chimokine soluble, le SLC (*Secondary Lymphoid Chemokine*), produit par

les cellules endothéliales des veinules des ganglions. Ce couple participe à la migration des lymphocytes T vers les ganglions lymphatiques (Forster *et al.*, 1999).

b. Interaction lymphocyte T-CPA

Les ligands exprimés par les parois endothéliales des vaisseaux des ganglions sont aussi exprimés par les cellules présentatrices d'antigène, et en particulier par les cellules dendritiques. Ainsi, les couples de molécules d'adhésion impliqués dans la migration des lymphocytes participent également à l'interaction CPA-lymphocytes T pour initier l'interaction. Une fois que le lymphocyte T a rencontré une CPA qui présente un peptide antigénique qu'il peut reconnaître, les molécules d'adhérence participent à renforcer cette interaction et fournissent un co-signal de stimulation.

Les principales molécules d'adhérence qui participent à l'interaction entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice d'antigène sont : CD2/LFA-3 (CD58), LFA-1/ICAM-1 et ICAM-2 et ICAM-3(CD50)/DC-SIGN (fig. 11).

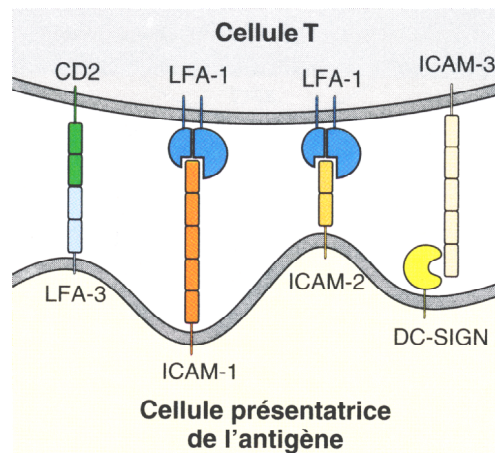


Figure 11. Molécules d'adhérence dans l'interaction DC-lymphocyte T (Janeway, 2003).

Le CD2 appartient à la superfamille des immunoglobulines et interagit avec LFA-3 (CD58) pour renforcer l'interaction T et participer à la transduction du signal d'activation. Des anticorps anti-CD2 ou du LFA-3 recombinant permettent d'induire la sécrétion d'IL2 et la prolifération des lymphocytes T (Meuer *et al.*, 1984; Dustin *et al.*, 1989a). Le CD2 semble aussi capable d'induire la mort cellulaire des cellules T activées de façon Fas indépendante, contribuant ainsi directement à l'élimination des lymphocytes T durant la phase de contraction (Mollereau *et al.*, 1996).

La signalisation par le TCR ou le CD2 induit un changement de conformation de LFA-1, ce qui augmente fortement son affinité pour ICAM-1 et ICAM-2 (Dustin *et al.*, 1989b; van Kooyk *et al.*, 1989; Lollo *et al.*, 1993) et initie la transduction du signal (Ward *et al.*, 1992; Costello *et al.*, 1993). De plus, LFA-1 participe à la formation de la synapse immunologique (Grakoui *et al.*, 1999).

Les molécules d'adhérence sont impliquées dans les réponses primaires et secondaires, à l'exception peut-être de l'interaction ICAM-3/DC-SIGN. La molécule DC-SIGN étant exprimée exclusivement à la surface des cellules dendritiques, ceci suggère en effet que l'interaction ICAM-3/DC-SIGN est impliquée principalement dans la réponse immunitaire primaire (Geijtenbeek *et al.*, 2000). Outre sa liaison à DC-SIGN, ICAM-3 peut interagir avec LFA-1 et régule l'interaction LFA-1/ICAM-1 (Campanero *et al.*, 1993). ICAM-3 est exprimé par les lymphocytes T au repos (de Fougerolles *et al.*, 1993) et participe à la transduction du signal d'activation (Hernandez-Caselles *et al.*, 1993; Juan *et al.*, 1994). Il semble que l'interaction avec ICAM-3 soit un des premiers contacts entre la cellule présentatrice d'antigène et le lymphocyte T (Montoya *et al.*, 2002).

c. Migration vers les tissus périphériques

Les molécules d'adhérence sont également impliquées dans la migration des lymphocytes T activés vers les tissus périphériques, où ils vont exercer leurs fonctions. Ainsi, l'augmentation d'expression de VLA-4 (*Very Late Antigen*) par les lymphocytes T activés leur permet d'interagir avec VCAM-1 dont l'expression est induite à la surface des cellules endothéliales activées (Elices *et al.*, 1990). Les interactions LFA-1/ICAM-1 et CD2/LFA-3 participent également à ce processus (Savage *et al.*, 1993). De plus, l'expression différentielle des molécules d'adhérence par les sous-populations T peut les orienter vers des sites spécifiques (par exemple, les lymphocytes T qui se localisent dans la peau expriment CLA - *Cutaneous Leucocyte Antigen*) (Le Gal *et al.*, 2001).

2. Molécules de co-stimulation

Le signal 2 de co-stimulation est non spécifique et indispensable à l'activation des lymphocytes T naïfs. S'il est absent, la réponse générée sera abortive, les lymphocytes T seront soit rendus anergiques, c'est-à-dire qu'ils seront incapables de proliférer, de sécréter des cytokines ou d'exercer leur fonctions de lyse, soit déletés. Ce processus permet de maintenir la tolérance périphérique (pour revue, (Bretscher, 1999)). Au cours des re-stimulations antigéniques éventuelles, la délivrance de signaux de co-stimulation n'est plus cruciale, mais elle contribue néanmoins à augmenter le niveau de la réponse.

Les molécules de co-stimulation sont regroupées dans 2 grandes familles selon leur structure. Les membres de la famille CD28 appartiennent à la super-famille des immunoglobulines, alors que l'autre grand groupe de molécules de co-stimulation est représenté par certains des membres de la famille du TNF (fig. 12).

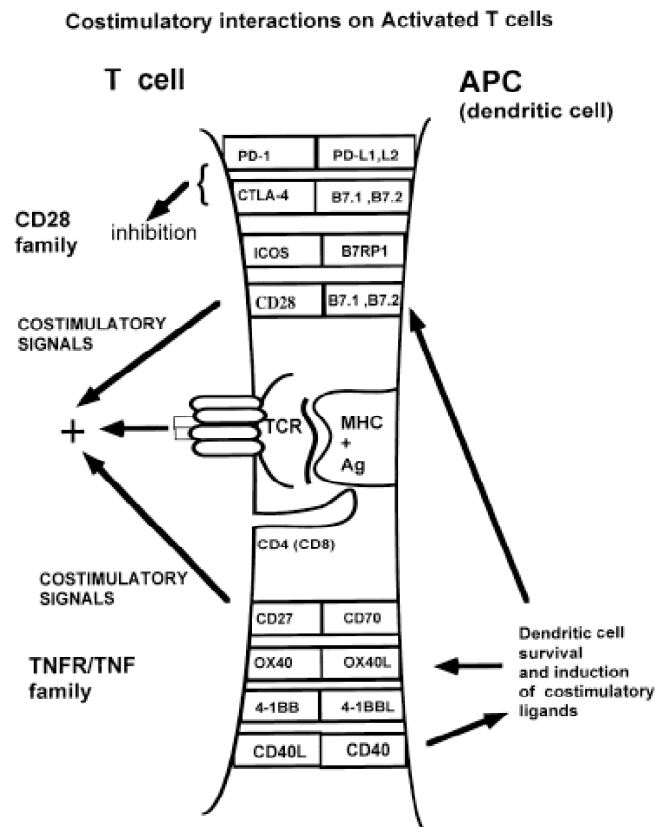


Figure 12. Principales molécules de co-stimulation intervenant dans l'interaction DC-lymphocytes T (Bertram et al., 2004b).

a. Famille du CD28

Le CD28 est exprimé constitutivement par les lymphocytes T naïfs et se fixe à ses ligands B7.1 et B7.2 (CD80 et CD86). B7.2 est exprimé constitutivement à bas bruit sur la plupart des cellules présentatrices d'antigène et l'expression est rapidement augmentée suite à l'activation. B7.1 apparaît plus tardivement (Hathcock *et al.*, 1994). Malgré de légères différences de cinétique d'expression, ces 2 molécules ont des fonctions largement redondantes. L'interaction avec le CD28, en combinaison avec une stimulation par le CD3 ou le CD2, fournit un fort signal de co-stimulation qui se manifeste par une augmentation prolongée de la prolifération. La co-stimulation assure également une forte augmentation de la production de cytokines (IL2, TNF- α , IFN- γ), à la fois en augmentant leur transcription et la stabilisation des messagers (Thompson *et al.*, 1989; Fraser *et al.*, 1993). De plus, la co-stimulation permet une induction des sous-unités α et β du récepteur à l'IL2 (Cerdan *et al.*, 1992; Cerdan *et al.*, 1995). Enfin, Boise *et al.* ont montré que l'activation du CD28 favorisait la survie des lymphocytes T en augmentant l'expression de Bcl-x_L (Boise *et al.*, 1995). Le rôle anti-apoptotique du CD28 a été confirmé dans d'autres études (Collette *et al.*, 1997).

Au cours des re-stimulations successives, le CD28 est fréquemment perdu (Linsley *et al.*, 1993). Ainsi, *in vitro*, les lignées polyclonales T ou les clones sont fréquemment CD28-. On sait également qu'*in vivo*, le répertoire T dirigé contre des antigènes issus d'infections latentes et récurrentes comme le CMV contient une grande proportion de lymphocytes T CD28-.

Différentes stratégies d'immunothérapie tentent de tirer profit la co-stimulation par le couple CD28/B7. Ainsi, la transfection de lignées tumorales par les molécules B7 peut permettre d'augmenter leur immunogénicité (Schadendorf *et al.*, 2000). Inversement, on tente de bloquer cette voie dans les maladies auto-immunes ou pour éviter les rejets en transplantation. Il semble cependant plus judicieux de moduler l'interaction en agissant sur le CD28, puisque les lymphocytes expriment également du CTLA-4 (CD152). Le CTLA-4 appartient à la même famille que le CD28 (Brunet *et al.*, 1987) et il se lie aussi à B7.1 et B7.2, avec une affinité supérieure à celle du CD28 (Linsley *et al.*, 1994). Son expression est induite suite à l'activation du TCR, et il a un rôle inhibiteur (Krummel *et al.*, 1995; Walunas *et al.*, 1996). Le blocage du CTLA-4 peut également présenter un intérêt thérapeutique, puisqu'il a été montré qu'il pouvait augmenter l'immunité anti-tumorale (Leach *et al.*, 1996).

ICOS (*inductible T cell costimulator*) est un autre membre de la famille du CD28. Il est exprimé par les lymphocytes T CD4 et les CD8, quoique plus faiblement par les CD8 (Hutloff

et al., 1999). Les lymphocytes T naïfs de souris *icos*^{-/-} ont des capacités de prolifération quasi normales et ICOS semble principalement impliqué dans la commutation isotypique des immunoglobulines (McAdam *et al.*, 2001) et dans la co-stimulation des CD4 (Kopf *et al.*, 2000). Cependant, la transfection du ligand de ICOS (ICOS-L ou B7h ou B7 H2) dans des tumeurs permet à des souris d'établir une réponse immunitaire protectrice, corrélant avec une réponse lymphocytaire T cytotoxique augmentée (Liu *et al.*, 2001). Récemment, il a été montré que des lymphocytes T CD8 stimulés par de l'anti-CD3 proliféraient plus fortement en présence d'anticorps anti-ICOS immobilisé (Watanabe *et al.*, 2005).

PD-1 (*programmed death-1*) est exprimé par les lymphocytes T CD4 et CD8 activés, et par les lymphocytes B et les cellules myéloïdes (Agata *et al.*, 1996). Les ligands de PD-1, B7 H1 (PDL-1) et B7 DC (PDL-2) sont homologues à B7.1 et B7.2. PD-1 n'est pas une molécule de co-stimulation, mais plutôt un régulateur, puisqu'elle a un rôle inhibiteur de l'activation T. Les lymphocytes T stimulés par de l'anti-CD3 prolifèrent moins et produisent moins d'IL2 en présence de PD-1-Fc immobilisé (Freeman *et al.*, 2000; Carter *et al.*, 2002). L'interaction aboutit à un arrêt du cycle cellulaire, mais pas à la mort des cellules (Latchman *et al.*, 2001). De plus, les souris transgéniques pour un TCR et déficientes en PD-1 ont tendance à développer des maladies auto-immunes (Nishimura *et al.*, 1999). Une étude récente montre que le fait de bloquer B7 H1 ou PD-1 par des anticorps monoclonaux permet d'augmenter la fréquence de rejet des tumeurs (Hirano *et al.*, 2005), alors que la transfection de PDL-1 dans les tumeurs les rend au contraire moins susceptibles à la lyse T (Iwai *et al.*, 2002). Cependant des résultats divergents ont également été obtenus. Dong *et al.* ont montré que la stimulation par B7 H1 augmentait la prolifération des lymphocytes T ainsi que la sécrétion d'IL10 (Dong *et al.*, 1999). B7 DC permet également une augmentation de la prolifération et de la sécrétion d'IFN- γ (Tseng *et al.*, 2001) et quand il est exprimé par des cellules tumorales, elles sont rejetées par un mécanisme dépendant des CD8 (Liu *et al.*, 2001). Récemment, il a été montré que les lymphocytes T CD4 des souris B7 DC^{-/-} produisaient des quantités moindres d'IFN- γ et que la réponse cytotoxique des CD8 était diminuée, avec des progressions tumorales accélérées (Shin *et al.*, 2005). Ces résultats contradictoires laissent supposer que PD-1 ne serait pas le seul récepteur des ligands B7 H1 et B7 DC, qui pourraient également interagir avec un récepteur activateur pas encore caractérisé, selon un système analogue à CD28/CTLA-4 et B7.1/B7.2.

b. Membres de la famille du récepteur au TNF (TNFR)

Les membres de la famille du TNF se répartissent en 2 groupes selon que leur récepteur contient un domaine de mort (DD pour *Death Domain*) ou un motif TRAF (*TNF Receptor Associated Factor*). Le motif DD permet d'activer la voie des caspases aboutissant à l'apoptose. Fas est le chef de file de ce groupe. La transduction du signal par TRAF est associée à l'activation, la différenciation et la survie cellulaire. Ainsi, les membres de ce groupe, auxquels nous nous intéresserons ici, sont des molécules de co-stimulation. Pour la plupart de ces molécules, l'interaction entre le ligand et le récepteur transmet un signal d'activation à la fois aux cellules qui expriment le récepteur et aux cellules qui expriment le ligand (signal bi-directionnel).

- CD27

Le ligand du CD27 (TNFR) est le CD70 (Goodwin *et al.*, 1993a; Bowman *et al.*, 1994). Le CD27 est exprimé par les NK, les lymphocytes B, et par la majorité des lymphocytes T CD4 et CD8 naïfs (Lens *et al.*, 1998). Chez l'homme, l'expression du CD27 augmente transitoirement pendant l'activation (Gravestein *et al.*, 1993) et est ensuite diminuée sur les lymphocytes T effecteurs après plusieurs cycles de division. La perte du CD27 est irréversible et est associée à un phénotype d'effecteur en phase tardive de différenciation, ce qui suggère qu'il est impliqué relativement tôt dans la réponse (Hintzen *et al.*, 1994; Hamann *et al.*, 1997). Le CD70 est exprimé par les lymphocytes T activés, les cellules B et les cellules dendritiques. Le profil d'expression de ces 2 molécules suggère donc que le CD27 des lymphocytes T reçoit un signal provenant des lymphocytes B activés, des DC ou par des interactions T-T. L'activation du CD27 augmente la prolifération globale des lymphocytes T CD4 et CD8, mais vraisemblablement plutôt par un rôle de facteur de survie que par une augmentation du nombre de division cellulaire (Hendriks *et al.*, 2003). Les souris transgéniques chez lesquelles l'expression du CD70 est forcée (placé sous le contrôle du promoteur du CD19) ont une augmentation du nombre de CD4 et de CD8 et répondent de manière plus intense aux infections par le virus Influenza (Arens *et al.*, 2001). Cependant elles deviennent sensibles aux infections opportunistes à cause d'un état d'immunodépression qui s'installe, attribué à un appauvrissement progressif du réservoir de lymphocytes T naïfs (Tesselaar *et al.*, 2003). Une étude menée chez des souris KO pour le CD28 et le CD27 a évalué la contribution relative de ces 2 molécules au cours de l'expansion T : le rôle du CD28 sur l'augmentation

des divisions cellulaires est confirmé, alors que le CD27 est principalement impliqué dans la survie des lymphocytes (Hendriks *et al.*, 2003).

- 4-1BB

- Caractérisation

Le couple 4-1BB/4-1BBL a été caractérisé d'abord chez la souris puis chez l'homme. Chez la souris, l'ADNc du 4-1BB a été isolé à partir d'une banque soustractive, le caractérisant comme une molécule inductible par l'activation des lymphocytes T (Kwon *et al.*, 1989). Le ligand a été ensuite isolé à partir d'une banque en COS du thymome EL4 à l'aide de 4-1BB/Fc recombinant (Goodwin *et al.*, 1993b). Le 4-1BB humain a été cloné par deux approches parallèles. Une première équipe a cloné un gène pour une molécule appelée ILA (*Induced by Lymphocyte Activation*) à partir d'une banque de lymphocyte T transformé par le virus HTLV-1 (Schwarz *et al.*, 1993), qui s'est avérée être l'homologue humain du 4-1BB. Simultanément, une autre équipe a caractérisé le 4-1BB humain par hybridation croisée entre l'ADNc du 4-1BB murin et une banque d'ADNc préparée à partir de PBL (*Peripheral Blood Lymphocyte*) stimulés. Ils ont également identifié le ligand, exprimé par un clone T CD4 activé, qui se fixait au 4-1BB/Fc humain (Alderson *et al.*, 1994). Leur première tentative infructueuse d'isoler d'abord le ligand du 4-1BB par hybridation croisée avec l'ADNc du 4-1BBL murin, illustre la faible homologie qui existe entre les deux espèces pour cette molécule.

- Expression

Le 4-1BB est exprimé à la surface des lymphocytes T activés. *In vitro*, des études menées chez la souris montrent que l'expression du 4-1BB est maximale à 48h et décline à partir de 4-5 jours (Vinay *et al.*, 1998; Cannons *et al.*, 2001). *In vivo*, et toujours chez la souris, il semble que l'expression du 4-1BB soit plus précoce et plus transitoire ; elle coïnciderait avec l'expression de la molécule d'activation CD69 (Dawicki *et al.*, 2004). Les lymphocytes CD4 (Th1 et Th2) et CD8 expriment le 4-1BB, cependant, il semble que le 4-1BB soit exprimé plus rapidement et plus intensément sur les lymphocytes T CD8 à la fois chez la souris et chez l'homme (Taraban *et al.*, 2002; Wen *et al.*, 2002). De plus, chez la souris, le 4-1BB semble être exprimé constitutivement mais faiblement par les lymphocytes T régulateurs (Treg) (Choi *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004). Le 4-1BB n'est pas exprimé que par les lymphocytes T : il est constitutif sur les monocytes et sur certaines DC (Kienzle *et al.*, 2000; Pauly *et al.*, 2002).

L'engagement du 4-1BB par du 4-1BBL ou par un anticorps anti-4-1BB induit la production d'IL6 et d'IL12 par les cellules dendritiques (Futagawa *et al.*, 2002). Le 4-1BB est également inductible sur les NK en réponse à l'IL2 (Wilcox *et al.*, 2002).

Plusieurs équipes ont décrit une expression du 4-1BBL à la surface des macrophages activés, des DC stimulées par du LPS ou du CD40L (Laderach *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003) et des lymphocytes B activés (Pollok *et al.*, 1994). Une étude a rapporté que la forme membranaire de 4-1BBL pouvait être clivée par une métalloprotéase (non définie à ce jour), générant une forme soluble de 4-1BBL. Le rôle physiologique de cette forme soluble n'est pas déterminé, mais elle est présente en plus grande quantité chez des patients atteints de différentes hémopathies malignes (Salih *et al.*, 2001).

Le 4-1BBL est également exprimé, avec une cinétique d'apparition plus précoce que le 4-1BB à la surface des lymphocytes T activés (Alderson *et al.*, 1994; Schwarz *et al.*, 1996). L'activation de ce 4-1BBL semble induire une apoptose massive des lymphocytes T (Schwarz *et al.*, 1996) mais aucune étude depuis n'est venue confirmer ces résultats.

Enfin, sur certaines lignées tumorales, le 4-1BBL peut être exprimé constitutivement (Salih *et al.*, 2000).

– Outils disponibles pour l'étude du couple 4-1BB/4-1BBL

Différents outils ont été développés pour étudier le rôle du couple 4-1BB/4-1BBL.

Des anticorps agonistes anti-4-1BB sont disponibles chez l'homme (Garni-Wagner *et al.*, 1996) et la souris (Pollok *et al.*, 1993). Une équipe a transfecté la lignée cellulaire P815 avec le 4-1BBL humain ainsi qu'avec le CD32 (récepteur pour les fragments Fc des immunoglobulines, ce qui permet d'y associer des anticorps, comme l'anti-CD3) (Wen *et al.*, 2002). D'autres stratégies utilisent des formes recombinantes chimériques de 4-1BB, comme du 4-1BB couplé au fragment Fc (4-1BB/Fc) (Goodwin *et al.*, 1993b; Alderson *et al.*, 1994) ou à l'alkaline phosphatase (Pollok *et al.*, 1994). Ces protéines sont généralement utilisées en soluble pour bloquer l'interaction 4-1BB/4-1BBL. Jusqu'à présent, une seule équipe, chez la souris, a produit et utilisé du 4-1BBL recombinant (Saoulli *et al.*, 1998).

Il existe également des souris « knock-out » pour le 4-1BB (Kwon *et al.*, 2002b) et pour le 4-1BBL (DeBenedette *et al.*, 1999).

– Molécule de co-stimulation

De nombreuses études ont établi que la stimulation du 4-1BB augmentait la prolifération et la sécrétion de cytokines par les lymphocytes T, aussi bien chez l'homme que chez la souris

(pour revue, (Kwon *et al.*, 2002a)). Chez la souris, un anticorps agoniste anti-4-1BB co-stimule la prolifération de splénocytes activés par de l'anti-CD3 et augmente la sécrétion d'IL2 (Hurtado *et al.*, 1997) alors que dans le même modèle, l'addition de 4-1BB/Fc a un rôle inhibiteur (Hurtado *et al.*, 1995). De même, des lignées transfectées par le 4-1BBL augmentent la prolifération des lymphocytes T en réponse à des doses sub-optimales de signal 1 chez la souris (Goodwin *et al.*, 1993b) et chez l'homme (Wen *et al.*, 2002). Les premières études ont montré chez la souris qu'un anticorps anti-4-1BB co-stimulait préférentiellement les T CD8 (Shuford *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 1999), mais d'autres ont montré, également chez la souris, que le 4-1BBL transfecté dans des cellules présentatrices d'antigène permettait de co-stimuler tout aussi efficacement les lymphocytes T CD4 (Gramaglia *et al.*, 2000; Cannons *et al.*, 2001).

Une fois cet aspect établi, plusieurs équipes ont cherché à évaluer l'impact de la co-stimulation par le 4-1BB par rapport à la co-stimulation CD28. Tout d'abord, dans un modèle de souris CD28^{-/-}, de Benedette *et al.* ont montré que le couple 4-1BB/4-1BBL pouvait fonctionner indépendamment du signal CD28 (DeBenedette *et al.*, 1997). Cependant, *in vivo*, le blocage de la voie CD28 semble inhiber la capacité de l'anticorps anti-4-1BB à générer des effecteurs cytotoxiques en réponses à des stimulations antigéniques (Diehl *et al.*, 2002). De fait, au cours de l'activation primaire, la co-stimulation avec du 4-1BBL n'est pas aussi efficace que la co-stimulation CD28 pour induire une forte production d'IL2 par les cellules CD28⁺ (Saoulli *et al.*, 1998). Le 4-1BB est néanmoins capable de co-stimuler la prolifération des lymphocytes T une fois qu'ils ont perdu le CD28 (Kim *et al.*, 2002; Bukczynski *et al.*, 2003). Ainsi, alors que le CD28 joue un rôle primordial au début de la primo-activation, le 4-1BB interviendrait plus tardivement au cours de la réponse primaire puis de façon importante au cours des réponses secondaires (Bertram *et al.*, 2002; Bertram *et al.*, 2004a).

– Rôle anti-apoptotique

L'implication du 4-1BB dans la réponse T est double : l'activité de co-stimulation stricte est renforcée par une action anti-apoptotique qui représente peut-être le véritable rôle du 4-1BB. L'engagement du 4-1BB inhibe l'AICD observée au cours des restimulations successives de splénocytes par de l'anti-CD3 (*Apoptosis-Induced Cell death*) (Hurtado *et al.*, 1997). Le rôle anti-apoptotique du 4-1BB a également été documenté chez l'homme. Cette action passe par une augmentation des taux des protéines anti-apoptotiques c-FLIP_{short} et Bcl-X_L (Lee *et al.*, 2002a; Starck *et al.*, 2005).

– Applications thérapeutiques

Rapidement après la caractérisation du 4-1BB, des équipes ont cherché à mettre à profit son potentiel de co-stimulation pour augmenter les réponses T, en particulier dans le contexte tumoral (Cheuk *et al.*, 2004). Chez la souris, des régressions tumorales significatives ont pu être observées après administration d'un anticorps agoniste anti-4-1BB, même contre des tumeurs peu immunogènes (Melero *et al.*, 1997). L'injection d'adénovirus recombinants codant pour le 4-1BBL, éventuellement en association avec de l'IL12, permet également des régressions de tumeurs du foie et du colon (Martinet *et al.*, 2000). L'effet anti-tumoral direct est dû aux lymphocytes T CD8, dont les fonctions cytotoxiques sont augmentées. Cependant, les NK, bien qu'ils ne soient pas capables de lyser les cellules tumorales, sont indispensables (Melero *et al.*, 1998; Wilcox *et al.*, 2002). Ainsi, le mécanisme d'action anti-tumoral *in vivo* du 4-1BB pourrait être d'activer d'abord les NK, qui stimuleraient ensuite les lymphocytes T, entre autres en sécrétant de l'IFN- γ (Pan *et al.*, 2004).

Dans des modèles expérimentaux de maladies auto-immunes chez la souris, l'injection d'un anticorps agoniste anti-4-1BB inhibe le développement d'arthrite induite au collagène (Seo *et al.*, 2004). De même, chez des souris Fas déficientes qui développent spontanément des maladies auto-immunes de type lupus, l'injection d'anti-4-1BB agoniste bloque le développement de la maladie et prolonge la survie des animaux traités. Le traitement induit la déplétion progressive des lymphocytes B auto-réactifs selon un mécanisme dépendant d'une augmentation de production d'IFN- γ (Sun *et al.*, 2002a). Des résultats similaires ont été obtenus dans des modèles d'encéphalomyélite auto-immune (Sun *et al.*, 2002b).

Récemment, une étude a mis en évidence l'intérêt de ces anticorps pour prévenir la survenue de GvH chronique (Kim *et al.*, 2005). Ces résultats sont en désaccord avec une étude publiée antérieurement dans un modèle très similaire de GvH aiguë (injection de cellules spléniques et lymphatiques parentales à des souris hybrides) qui montre de l'injection d'anti-4-1BB accélère au contraire la survenue d'une GvH ainsi que le rejet de greffe de peau et de cœur (Shuford *et al.*, 1997).

Les mécanismes d'action expliquant l'efficacité thérapeutique potentielle des anti-4-1BB agonistes dans ces modèles, de physiopathologie différente, ne sont pas clairement élucidés, mais pourraient être liés à une inhibition de la réponse humorale impliquant une induction d'anergie des T CD4 (Mittler *et al.*, 1999; Foell *et al.*, 2003).

Le développement de thérapies visant à injecter des anticorps agonistes anti-4-1BB pose donc des problèmes conceptuels de part les nombreuses cibles cellulaires potentielles, laissant prévoir des effets indésirables notables. Ainsi, les stratégies exploitant le potentiel de co-stimulation du couple 4-1BB/4-1BBL pour générer des effecteurs T utilisables dans des protocoles de transfert adoptif semblent plus séduisantes (Maus *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003b).

- Autres membres de la famille du récepteur au TNF

La famille des récepteurs au TNF est constituée de nombreuses molécules de co-stimulation, mais toutes n'ont pas un rôle principal sur l'activation des lymphocytes T CD8, qui nous concernent plus particulièrement ici.

- OX40/OX40L

OX40 est exprimé principalement par les lymphocytes T CD4 activés, et plus particulièrement par les Th2 (Weinberg *et al.*, 1998). OX40L est exprimé par les cellules présentatrices de l'antigène comme les DC et les lymphocytes B plusieurs heures à plusieurs jours après leur activation (Ohshima *et al.*, 1997). Le couple OX40/OX40L est impliqué dans l'augmentation de prolifération et de sécrétion de cytokines par les lymphocytes T CD4 durant les réponses primaire et secondaire (Linton *et al.*, 2003; Watts, 2005). Ainsi, des souris déficientes en OX40 infectées par du LCMV (*Lymphocytic Choriomeningitis Virus*) ont une réponse T CD4 diminuée (Kopf *et al.*, 1999). Comme de nombreux couples de la famille du TNF/TNFR, le couple OX40/OX40L fonctionne de manière bi-directionnelle, et un défaut de signalisation par l'OX40L aboutit à des fonctions de présentation d'antigène altérées (Murata *et al.*, 2000).

- HVEM/LIGHT

HVEM (*Herpes Virus Entry Mediator*) se fixe à deux membres de la famille du TNF : Lt α 3 et LIGHT. LIGHT peut lui se lier à trois récepteurs différents : HVEM, LT β R et DcR3/TR6 (récepteur soluble). HVEM est exprimé par les lymphocytes T au repos, les monocytes et les DC immatures. LIGHT est exprimé par les lymphocytes T CD4 et CD8 activés, les monocytes, les NK et par les DC immatures. Plusieurs études suggèrent que le couple HVEM/LIGHT est impliqué directement dans la co-stimulation de la prolifération T (Tamada *et al.*, 2000; La *et al.*, 2002). De plus, LIGHT contribue indirectement à l'activation T en induisant, conjointement avec le CD40L, la maturation des DC (Morel *et al.*, 2001).

– GITR/GITRL

Le GITR (*Glucocorticoid-Induced TNFR family Related gene*) n'est exprimé que très faiblement par les lymphocytes T au repos et apparaît à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 activés (Kwon *et al.*, 1999). Néanmoins, le GITR est exprimé constitutivement par les lymphocytes régulateurs CD4+CD25+. Le GITRL est faiblement exprimé par les lymphocytes B, les macrophages et les DC dérivant de la moelle osseuse. Son expression par les cellules présentatrices d'antigène est augmentée par la stimulation des TLR (*Toll Like Receptor*) mais diminue rapidement ensuite. Vu le profil d'expression, l'hypothèse la plus probable est que le GITR exprimé par les lymphocytes T activés reçoit un signal par le GITRL des cellules présentatrices d'antigène en début d'activation.

L'interaction GITR/GITRL est impliquée dans l'effet suppresseur des T reg puisque l'addition d'anti-GITR ou de GITRL soluble à des co-cultures de Treg avec des lymphocytes CD25- inhibe leur capacité suppressive (Ji *et al.*, 2004; Stephens *et al.*, 2004). L'hypothèse actuelle est que l'interaction entre le GITRL des APC et le GITR des lymphocytes nouvellement activés leur permet de résister à l'effet suppresseur des T reg. Plus tard au cours de la réponse, une fois que le GITRL devient limitant, les Treg auraient un avantage à s'y fixer de part leur meilleure expression du GITR et exerceraient alors leurs fonctions suppressives (Stephens *et al.*, 2004).

Bien que le rôle du GITR ait tout d'abord été controversé, de part son implication dans les fonctions suppressives des Treg, il est maintenant bien établi que le couple GITR/GITRL est un couple de co-stimulation. L'activation du GITR aboutit à une augmentation de prolifération et de sécrétion de cytokines (IL2, IFN- γ , IL4 et IL10) ainsi qu'à une meilleure survie des lymphocytes T (Tone *et al.*, 2003; Kanamaru *et al.*, 2004).

– CD30/CD30L

Le couple CD30/CD30L est proche du couple OX40/OX40L, puisque comme OX40, CD30 est exprimé préférentiellement par les lymphocytes Th2 (Del Prete *et al.*, 1995). Le CD30 est inductible à la surface des lymphocytes suite à une stimulation du TCR. Le CD30L est exprimé par les lymphocytes T activés et par les lymphocytes B au repos. Comme pour les autres membres de la famille, l'engagement du CD30 augmente la prolifération et la sécrétion de cytokines (Romagnani *et al.*, 1995; Tarkowski, 2003).

– CD40/CD40L

Le CD40 est exprimé constitutivement par les lymphocytes B et les cellules dendritiques. La source majeure de CD40L (CD154) est fournie par les lymphocytes T activés. L'interaction CD40/CD40L fournit des signaux de survie et de prolifération aux lymphocytes B (Gordon, 1995). Elle favorise leur différenciation en plasmocytes et participe à la commutation isotypique des immunoglobulines (Kawabe *et al.*, 1994). Chez l'homme, l'expression de formes mutées de CD154 est associée à un syndrome hyper-immunoglobulinémie M (DiSanto *et al.*, 1993). La stimulation du CD40 des cellules dendritiques leur fournit un second signal de maturation (Cella *et al.*, 1996) induisant une augmentation d'expression de molécules de co-stimulation (CD80 et CD86 et 4-1BBL) (Futagawa *et al.*, 2002), favorisant ainsi indirectement l'activation T.

III. METHODES DE GENERATION DE LYMPHOCYTES T CD8 A USAGE CLINIQUE

A. Nature et origine des lymphocytes injectés

Un des enjeux majeurs du développement des stratégies d'immunothérapie passive par injection de lymphocytes T CD8 réside dans la capacité à produire les cellules aisément et pour le plus grand nombre de patients.

Les lymphocytes T CD8 injectés à l'homme à ce jour sont de deux types. Ce sont soit des populations lymphocytaires polyclonales contenant présumément des cellules spécifiques (Labarriere *et al.*, 2002), parfois enrichies *ex vivo* (Meidenbauer *et al.*, 2003), soit des clones de spécificité connue (Vignard *et al.*, 2005).

Les lymphocytes peuvent être de deux origines : ils sont généralement issus du sang périphérique, mais dans le cadre de l'immunothérapie anti-tumorale, il a été envisagé de réinjecter des lymphocytes issus de la tumeur elle-même ou des ganglions envahis (TIL et TILN).

B. Critères exigés

Les critères d'exigence concernant la qualité des lymphocytes T et la nature des méthodes servant à les générer sont d'ordre varié.

1. Inocuité

L'injection ne doit pas être toxique, ainsi, les préparations injectées doivent être exemptes de toxines et de micro-organismes. En France, des normes strictes de sécurisation sanitaire sont en place et contrôlées par l'AFSSAPS.

2. Simplicité de la méthode

Les méthodes d'obtention des cellules à usage thérapeutique se doivent d'être les plus rapides possible. Elles doivent également être les plus reproductibles, les plus simples, et les moins coûteuses possible.

3. Nombre de cellules injectées

Jusqu'à présent, les protocoles d'immunothérapie anti-tumorale visent à injecter le plus grand nombre d'effecteurs possible. Néanmoins, une étude récente de notre laboratoire de suivi immunologique d'un protocole clinique d'injection de clones T anti-Melan-A/MART-1, n'a pas mis en évidence de corrélation ni entre le nombre de lymphocytes injectés et leur survie en périphérie ni entre le nombre de lymphocytes injectés et les réponses cliniques observées (Vignard *et al.*, 2005). Une autre étude concernant l'injection de TIL dans le mélanome n'avait pas non plus montré de corrélation entre l'efficacité thérapeutique et le nombre de lymphocytes spécifiques injectés (Labarriere *et al.*, 2002). Il est donc possible que le nombre de cellules à obtenir ne soit pas un critère déterminant.

4. Efficacité

Le suivi immunologique des protocoles thérapeutiques en cours, par l'analyse des réponses cliniques associée à la caractérisation des effecteurs injectés, devrait dans les années à venir renseigner sur la nature des lymphocytes T efficaces. A l'heure actuelle, particulièrement dans le contexte anti-tumoral, il n'y a pas de données cliniques permettant de déterminer les caractéristiques des cellules efficaces. Les questions en suspens concernent : les spécificités antigéniques à cibler préférentiellement, et leur phénotype qui caractérise :

- les capacités de migration des cellules vers les tumeurs,
- leur capacité cytotoxique,
- leur potentiel prolifératif
- leur capacité de survie in vivo,
- leur capacité de migration vers les ganglions

C. Méthodes utilisées

De nombreuses méthodes ont été envisagées pour amplifier des lymphocytes T CD8 *ex vivo*. On distingue des **méthodes cellulaires**, basées sur des co-cultures des lymphocytes T avec des cellules présentatrices d'antigène, qui sont les méthodes actuellement utilisées dans les protocoles cliniques et des **méthodes acellulaires**, en développement, basées sur l'utilisation de ligands activateurs recombinants en l'absence de cellules présentatrices d'antigène.

1. Méthodes cellulaires

Les premières méthodes développées sont basées sur l'utilisation de lignées cellulaires servant de cellules nourricières ou de cellules présentatrices d'antigène. Selon la stratégie choisie, ces méthodes permettent d'amplifier les lymphocytes totaux, ou d'enrichir spécifiquement les lymphocytes dirigés contre un complexe CMH-peptide donné.

a. Méthodes cellulaires non spécifiques d'antigène

- Génération et amplification de TIL

Pour amplifier des TIL, la première étape consiste, à partir de la tumeur ou des ganglions envahis, à les isoler et à les amplifier spécifiquement. Ceci est généralement réalisé en mettant en culture le fragment, dissocié mécaniquement et enzymatiquement, avec des doses variables d'IL2 (Jotereau *et al.*, 1991; Rosenberg *et al.*, 1994). La culture de ces mêmes fragments dans du sérum de veau fœtal permet dans un certain nombre de cas d'établir la lignée tumorale correspondante.

Ensuite, les lymphocytes sont restimulés de manière polyclonale afin d'en obtenir un grand nombre. Cette méthode est largement utilisée, aussi bien pour l'étude fondamentale des lymphocytes T (restimulation de clones T et de lignées polyclonales T) que pour amplifier des cellules à usage clinique. Cette technique utilise des cellules nourricières (PBMC allogéniques et lignées B immortalisées par le virus de l'EBV et irradiées), associées à de l'IL2 (150UI/ml) et à un signal mitogénique (phytohéماغglutinine, PHA, ou anti-CD3). Cette méthode d'amplification a été utilisée dans un protocole clinique réalisé par notre équipe pour expandre *ex vivo* des TIL (Pandolfino *et al.*, 2001; Dreno *et al.*, 2002).

- Amplification des PBMC totaux

Dans le cadre de l'immunothérapie cellulaire post-greffe, les cellules spécifiques d'intérêt sont contenues dans le sang périphérique. Ainsi, il est possible d'injecter des lymphocytes T du donneur préalablement multipliés *ex vivo* en présence d'IL2 et d'anti-CD3. Cette méthode permet d'amplifier préférentiellement les lymphocytes CD3⁺ CD4 et CD8 (Tiberghien *et al.*, 2001). Par mesure de précaution en cas de survenue d'une GvH, les cellules injectées sont

parfois transfectées par un gène suicide, comme le gène de la thymidine kinase, qui leur confère une sensibilité au ganciclovir.

- Utilisation de lignées transfectées

Une autre méthode d'amplification lymphocytaire non spécifique d'antigène est développée par Maus *et al.* Elle n'est pas encore utilisée dans le cadre de protocole clinique. Cette méthode est basée sur la co-culture des lymphocytes T à expandre avec une lignée cellulaire, la K562 transfectée par le CD32 (appelée lignée K32) et du 4-1BBL humain. Le CD32 est le récepteur Fcγ de faible affinité, ce qui permet de charger ces cellules de manière exogène avec des anticorps tels que l'anti-CD3 et l'anti-CD28 (Maus *et al.*, 2002). Ces cellules expriment naturellement ICAM-1 et LFA-1, mais pas de molécules HLA. L'utilisation de lignée cellulaire établie offre une certaine reproductibilité. De plus, il est possible de sécuriser la lignée d'un point de vue sanitaire, et elle pourra ensuite être utilisée pour générer les cellules de tous les patients. Avec cette méthode, pour amplifier des cellules spécifiques, une étape supplémentaire d'isolement des cellules d'intérêt, par un tri multimère HLA-peptide, ou par cytométrie est nécessaire.

L'intérêt commun des méthodes d'amplification lymphocytaire T non spécifiques d'antigène est qu'elles permettent d'inclure dans les protocoles tous les patients, quel que soit leur phénotype HLA. L'inconvénient majeur est qu'il est difficile d'évaluer le biais du répertoire introduit : les cellules spécifiques d'intérêt n'ont pas nécessairement les mêmes caractéristiques de prolifération que les non spécifiques et peuvent être perdues au cours des restimulations. Ceci a été documenté par les études de Sauce *et al.* qui montrent que l'expansion des lymphocytes T par de l'anti-CD3 est associée à une diminution de la fréquence des lymphocytes T anti-EBV (Sauce *et al.*, 2002; Sauce *et al.*, 2003).

b. Méthodes cellulaires spécifiques d'antigène

A l'heure actuelle, compte tenu des connaissances acquises en immunothérapie et du développement technologique, il n'est plus envisageable d'injecter des populations cellulaires sans avoir documenté la présence de lymphocytes T de spécificité pertinente. Dans les protocoles actuels, l'injection de populations enrichies en lymphocytes T spécifiques, ou l'injection de clones T sont donc favorisées. Ainsi, des méthodes de génération de cellules

allant dans ce sens se sont développées. Différentes sources de cellules présentatrices d'antigènes peuvent être utilisées : des lignées cellulaires, des cellules dendritiques ou directement les cellules présentatrices contenues dans les PBMC.

- Utilisation de DC

Physiologiquement, les DC matures sont les cellules présentatrices d'antigène professionnelles capables d'induire *in vivo* de fortes proliférations des lymphocytes T. Elles expriment de nombreuses molécules de co-stimulation et peuvent générer des lymphocytes T à partir de populations naïves pour l'antigène considéré ou qui contiennent des cellules mémoires à de très faibles fréquences. Le protocole clinique mené par l'équipe de Greenberg a choisi cette méthode pour générer, à partir de PBMC de patients, des clones T dirigés contre des épitopes issus des antigènes Melan-A/MART-1 et gp100. Les DC autologues utilisées sont chargées en peptide de manière exogène. Les clones obtenus sont ensuite amplifiés en présence de cellules nourricières (PBMC autologues irradiés), d'IL2 et d'anti-CD3 (Yee *et al.*, 2002). Les lymphocytes T injectés dans le protocole de Meidenbauer *et al.* ont également été amplifiés à l'aide de DC chargées de manière exogène en peptide, mais les populations obtenues n'ont pas été clonées ensuite (Meidenbauer *et al.*, 2003). Cependant, l'utilisation des DC pour générer des lymphocytes T à usage clinique présente certains inconvénients. Cela nécessite de disposer de quantités de sang relativement importantes pour pouvoir obtenir suffisamment de DC matures, qu'il faut préparer pour chaque patient. De plus, le processus de maturation des DC *in vitro* à partir des monocytes sanguins est un processus long, coûteux, et peu reproductible.

- Lignée cellulaire

- humaines

L'utilisation de lignée cellulaire portant les épitopes antigéniques d'intérêt est la source la plus fréquente de cellules présentatrices d'antigènes. Pour amplifier des lymphocytes T anti-EBV, la stratégie la plus employée consiste, à partir d'une petite quantité de sang du donneur (environ 20ml) à générer une lignée B transformée par l'EBV. Cette lignée irradiée est ensuite co-cultivée avec les PBMC (ou les lymphocytes T CD8+) dans un système autologue en présence de doses très variables d'IL2 selon les protocoles (Rooney *et al.*, 1995). Des fibroblastes infectés par le virus du CMV peuvent servir de cellules présentatrices (Walter *et*

al., 1995). De l'anti-CD3 et des PBMC autologues irradiés peuvent également être ajoutés (Walter *et al.*, 1995; Bollard *et al.*, 2004). Les lymphocytes T amplifiés sont en général injectés tels quels (sans purification des cellules spécifiques), ou préalablement clonés.

Pour amplifier des lymphocytes T anti-tumoraux, le protocole par injection de clones réalisé dans notre équipe a utilisé comme cellule présentatrice d'antigène une lignée de mélanome allogénique établie. Les PBMC des patients sont co-cultivés avec cette lignée en présence d'IL2 et d'IL6. La population obtenue est ensuite clonée, les clones injectés étant sélectionnés sur la base de leur production d'IL2 en réponse des lignées tumorales. Afin d'obtenir un grand nombre de cellules, les clones obtenus sont ensuite amplifiés en présence de cellules nourricières (PBMC autologues irradiés), d'IL2 et de PHA (Gervois *et al.*, 2000; Vignard *et al.*, 2005).

– Cellule présentatrice d'antigène artificielle

D'autres stratégies sont basées sur l'utilisation de lignées non humaines comme source de lignées présentatrices d'antigènes spécifiques. Ainsi, l'équipe de Sadelain utilise une lignée de fibroblastes murins transfectée par des vecteurs oncorétroviraux codant pour un complexe HLA-peptide donné, ainsi que pour des molécules de co-stimulation comme B7.1, ICAM-1 et LFA-3 (Latouche *et al.*, 2000; Papanicolaou *et al.*, 2003; Dupont *et al.*, 2005). Ils n'utilisent pas de cellules nourricières. L'équipe de Sprent, dans un système développé chez la souris, a choisi d'utiliser des cellules de drosophiles transfectées, mais ces cellules ne sont pas stables à 37°C, causant d'une part une libération d'antigène de drosophiles dans le milieu de culture, et diminuant le temps de contact, d'autre part (Cai *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 1996). Cependant, dans le protocole clinique de Mitchell *et al.*, les lymphocytes T injectés ont été stimulés une première fois par des cellules de drosophiles remplacées ensuite par des APC autologues. Les PCR effectuées peu de temps avant l'injection des cellules n'ont pas mis en évidence de gène d'insecte (Mitchell *et al.*, 2002).

• Les cellules présentatrices d'antigène des PBMC

Les cellules présentatrices d'antigène contenues dans les PBMC sont principalement les lymphocytes B et les monocytes/macrophages. Ainsi, l'addition de peptides antigéniques dans des cultures de PBMC peut suffire pour réactiver des réponses mémoires et amplifier les lymphocytes T anti-CMV ou anti-BMLF-1. C'est la stratégie choisie par Einsele *et al.* pour

préparer des cellules anti-CMV destinées à être injectées à des patients ayant subi une greffe de moelle allogénique (Einsele *et al.*, 2002).

2. Méthodes acellulaires

Il y a plusieurs raisons pour lesquelles certaines équipes cherchent à développer des méthodes d'amplification de lymphocytes T en système acellulaire. Tout d'abord, ces méthodes présentent un intérêt fondamental qui consiste à définir précisément les signaux minimums requis pour amplifier des lymphocytes T, ainsi que le rôle particulier de chaque ligand sur le devenir de la population à expandre. Puis, pour un aspect pratique, il est séduisant de pouvoir se passer de cellules nourricières et de lignées présentatrices d'antigène, dont l'utilisation impose de lourdes contraintes de sécurisation sanitaire. De plus, l'utilisation de ligands recombinants immobilisés sur des supports inertes permet de développer des méthodes plus reproductibles. Comme pour les méthodes cellulaires, on distingue des méthodes non spécifiques d'antigènes et des méthodes spécifiques.

a. Méthodes acellulaires non spécifiques d'antigène

Une méthode d'amplification non spécifique des lymphocytes T est représentée par l'utilisation de billes sur lesquelles sont immobilisés de l'anti-CD3 associé à de l'anti-CD28. Cette technologie a été développée par la société Dynal. Plus récemment, la société Miltenyi a développé une technique très similaire, utilisant des billes plus petites et d'une autre nature physico-chimique sur lesquelles sont immobilisés de l'anti-CD3, de l'anti-CD2 et de l'anti-CD28. Théoriquement, cette méthode peut s'appliquer à l'expansion des lymphocytes T CD4 et CD8. Cependant, les lymphocytes T CD8 semblent s'amplifier moins bien que les lymphocytes T CD4 sur des périodes de cultures supérieures à 10 jours (Oelke *et al.*, 2005).

b. Méthodes acellulaires spécifiques d'antigène

Récemment, une méthode d'amplification des lymphocytes T spécifiques en système acellulaire a été développée. Elle utilise des molécules de CMH-peptide recombinant (chimérique et dimérisé par un fragment Fc) associées à de l'anti-CD28 immobilisés sur des billes magnétiques. Cette technique a été utilisée comparativement à des cellules dendritiques

chargées en peptide pour amplifier des lymphocytes anti-pp65 et anti-Melan-A/MART-1. Le protocole consiste à re-stimuler les populations 3 fois, à une semaine d'intervalle en présence d'IL2. Les auteurs montrent que cette méthode permet d'obtenir des pourcentages de cellules spécifiques importants, identiques à ceux qu'ils obtiennent avec des DC pour les lymphocytes T pp65 (de 58 à 92% de cellules spécifiques), et globalement supérieurs pour les lymphocytes T anti-Melan-A/MART-1 (Oelke *et al.*, 2003).

D'autres types de supports peuvent être utilisés, comme des billes en latex (Tham *et al.*, 2001) ou des liposomes (Prakken *et al.*, 2000). Ces techniques ont été utilisées dans des modèles murins pour restimuler des lymphocytes T de souris transgéniques. La méthode utilisant des liposomes a été mise à profit pour amplifier des lymphocytes T CD4.

Jusqu'à présent, toutes les cellules injectées à des patients ont préalablement été amplifiées *ex vivo*. L'ensemble des méthodes présentées permet généralement de forts taux d'amplification des cellules, autorisant l'injection de grand nombre d'effecteurs. Toutefois, très récemment, une équipe a montré qu'il était possible chez l'homme, dans le cadre de la reconstitution d'une immunité anti-CMV post-greffe de moelle, d'injecter sans aucune amplification préalable, un nombre faible de lymphocytes T triés par du monomère HLA-peptide (Cobbold *et al.*, 2005).

D. Projet de recherche et objectifs du travail

L'équipe de Francine Jotereau mène depuis de nombreuses années des recherches sur l'étude des lymphocytes T dirigés contre le mélanome. A ce titre, plusieurs essais d'immunothérapie par transfert adoptif des lymphocytes T CD8 ont été réalisés, que ce soit par injection de TIL (Labarriere *et al.*, 2002) ou de clones anti-Melan-A/MART-1 (Vignard *et al.*, 2005). Les méthodes utilisées pour générer les lymphocytes T sont basées sur leur re-stimulation polyclonale par de la PHA associée à de l'IL2 (150UI/ml) et des cellules nourricières. L'objectif est l'obtention d'un grand nombre d'effecteur cytotoxiques et sécréteurs d'IL2.

Le projet de recherche que nous développons consiste à mettre au point de nouvelles stratégies d'obtention de cellules spécifiques. Outre l'obtention de cellules spécifiques, un de nos objectifs consiste à mieux caractériser les effecteurs produits. En particulier, nous cherchons à évaluer l'impact des conditions d'amplification des cellules sur leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles. Pour cela, nous avons choisi de développer une méthode acellulaire d'amplification spécifique des lymphocytes T CD8 humains.

A mon arrivée dans le laboratoire, nous disposions déjà de complexes CMH-peptide recombinants (Bodinier *et al.*, 2000). Des expériences préliminaires montraient que la stimulation de clone T par du HLA-peptide seul induisait une apoptose massive des cellules (Bodinier, communication orale SFI, 2001). Ces résultats suggéraient qu'il était donc nécessaire d'adjoindre un signal de co-stimulation pour amplifier efficacement les lymphocytes T. Afin d'adjoindre un signal le plus physiologique possible, nous avons décidé d'utiliser un ligand de molécule de co-stimulation sous forme recombinante. Notre choix s'est porté sur le 4-1BBL (CD137L), qui se lie au 4-1BB exprimé par les lymphocytes T activés, et en particulier parce que des études montraient que le 4-1BB co-stimulait efficacement les lymphocytes T CD28- (DeBenedette *et al.*, 1997). Ceci suggérait que le 4-1BB pouvait remplacer la co-stimulation CD28, ce qui a été confirmé par la suite (Bertram *et al.*, 2002). De plus, aucun récepteur inhibiteur du 4-1BBL n'est décrit à ce jour.

Quand nous avons débuté ce projet (et c'est toujours vrai aujourd'hui), il n'existait pas de forme commerciale de 4-1BBL humain qui co-stimulait la prolifération des lymphocytes T. Le premier objectif de ce travail a donc consisté à produire une forme recombinante soluble de 4-1BBL humain. Une fois les protocoles de production, de renaturation et de purification établis, nous avons entrepris de caractériser biochimiquement et fonctionnellement la protéine dont nous disposions.

Introduction

Parallèlement, nous avons mené une étude par cytométrie de flux afin d'analyser finement l'expression du 4-1BB à la surface des lymphocytes T en réponse à une stimulation non spécifique par l'anti-CD3. Elle nous a permis de constater des différences significatives d'expression du 4-1BB selon les sous-populations considérées. Cette étude a été réalisée également afin de prévoir l'expression du 4-1BB à la surface des lymphocytes T stimulés de manière spécifique par du HLA recombinant.

Enfin, disposant de HLA-peptide et de 4-1BBL, nous avons pu mettre en place les premières expériences d'amplification des lymphocytes T spécifiques. Nous avons testé différentes combinaisons de signaux : HLA-peptide seul, HLA-peptide+anti-CD28 et HLA-peptide+4-1BBL. Pour cela, nous avons choisi d'immobiliser ces ligands à la surface de billes. Nous avons calibré ces billes, puis nous les avons utilisées en tant que cellules présentatrices d'antigène artificielles en co-culture avec des lymphocytes T. Notre modèle d'étude a consisté à amplifier et à caractériser les lymphocytes T dirigés contre un épitope du CMV issu de l'antigène pp65 et un épitope de l'EBV issu de l'antigène BMLF-1.

RESULTATS

I. ETUDE DE L'EXPRESSION DU 4-1BB SUR LES LYMPHOCYTES T

A. Résultats

Cette première étude a eu pour objet de définir précisément les conditions d'expression du 4-1BB (CD137) à la surface des lymphocytes T. Sur la base de données déjà publiées chez la souris et quelquefois chez l'homme, mais souvent controversées, nous avons cherché à vérifier un certain nombre d'éléments concernant l'induction du 4-1BB suite à une stimulation du complexe TCR/CD3.

1. Cinétique

Le 4-1BB est une protéine inductible exprimée principalement par les lymphocytes T, en réponse à une activation du complexe TCR/CD3. Des données de la littérature indiquent que l'ARNm de 4-1BB est détecté 3 heures après une stimulation de splénocytes par de l'anti-CD3. L'expression de surface augmente lentement et atteint un niveau maximum au bout de 60 heures (Vinay *et al.*, 1998).

Nous avons voulu déterminer la cinétique d'apparition du 4-1BB sur des lymphocytes T chez l'homme. Pour cela, nous avons stimulé des cellules mononucléées totales du sang périphérique (PBMC-*Peripheral Blood Mononuclear Cell*, constituées de 70% de lymphocytes T en moyenne) par un anticorps monoclonal anti-CD3 (OKT3) immobilisé au plastique. Les cellules ont ensuite été marquées par un anticorps monoclonal anti-4-1BB couplé à la phycoérythrine (clone 4B4-1, BD Biosciences).

En accord avec les données publiées, nous montrons que l'expression du 4-1BB débute rapidement suite à l'activation, et est maximale entre trois et quatre jours, en terme de pourcentage de cellules positives et de moyenne de fluorescence (MFI). L'expression diminue ensuite pour revenir au niveau basal au bout d'une semaine (fig. 1A). Il y a très peu de cellules (1,8%) qui expriment le 4-1BB sans stimulation (fig. 1B). Par la stimulation du CD3, le 4-1BB est exprimé quasi exclusivement par les lymphocytes T (88% des cellules 4-1BB+ sont CD3+). Une faible proportion de cellules CD3- exprime légèrement le 4-1BB dans ces conditions (7% des cellules totales) (fig. 1C). Il peut s'agir d'une population NK pour laquelle

il a été montré chez la souris que l'IL2 permettait une expression du 4-1BB (Wilcox *et al.*, 2002).

Pour la suite de cette étude, nous avons donc choisi d'étudier l'expression du 4-1BB au bout de 72h d'activation.

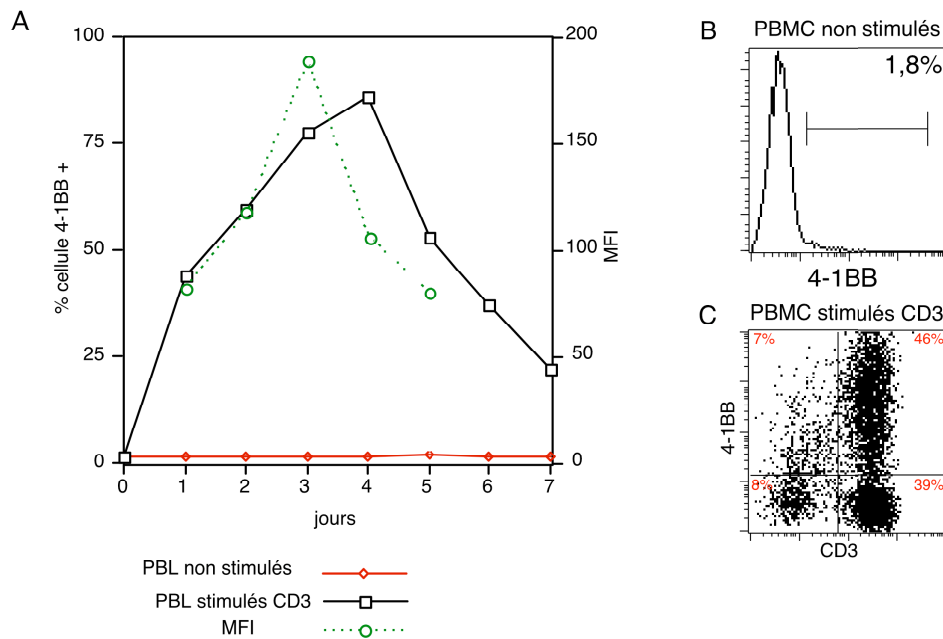


Figure 1. A. Cinétique d'expression du 4-1BB sur les PBMC. B. Marquage 4-1BB des PBMC non stimulés. C. Double marquage anti-CD3 et anti-4-1BB réalisé sur des PBMC stimulés par de l'anti-CD3 pendant 72h.

2. Expression du 4-1BB en fonction des conditions de stimulation

Nous avons ensuite voulu déterminer s'il existait des différences d'expression du 4-1BB sur les lymphocytes T (CD3+) selon que l'on active des PBMC ou des lymphocytes T purifiés (fig. 2). En effet, le 4-1BB étant une molécule inductible, il était important de déterminer si son expression suite à une stimulation CD3 dépendait d'autres facteurs et/ou cellules présentes dans les PBMC. Par exemple, une étude chez la souris indique qu'il n'y a pas d'expression de 4-1BB sur des lymphocytes T purifiés suite à une stimulation CD3 sans ajout d'IL2 exogène (Pollok *et al.*, 1995). Nous ne confirmons pas ces résultats chez l'homme, puisque nous montrons qu'il y a une expression du 4-1BB sur les lymphocytes T purifiés en absence d'IL2 exogène (fig. 2).

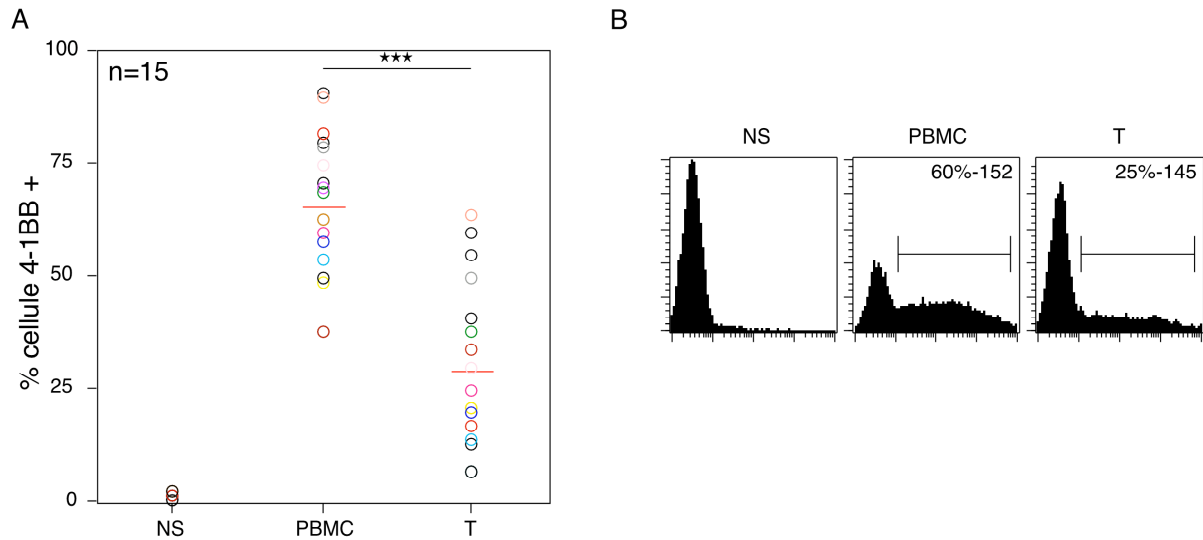


Figure 2. Expression de 4-1BB sur les lymphocytes T purifiés ou sur les lymphocytes T stimulés à partir des PBMC. Les lymphocytes T sont purifiés par la technique de « Rosette Sep » (StemCell Technology) selon les instructions du fournisseur (pureté > à 95%). Au bout de 72h de stimulation, les cellules sont analysées par double marquage CD3 et 4-1BB. A. Résultats obtenus sur l'ensemble des donneurs testés. L'analyse statistique a été effectuée par une analyse ANOVA suivie d'un test de Tukey-Kramer apparié (***: $p < 0,001$). B. Exemple sur un donneur représentatif.

Nous montrons qu'il y a une différence très significative ($p < 0,001$ par une analyse ANOVA suivie d'un test de Tukey-Kramer) d'expression du 4-1BB par les lymphocytes T CD3 entre une stimulation de PBMC ($65 \pm 4\%$) et une stimulation de T purifiés ($29 \pm 4\%$).

Ces résultats suggèrent qu'une grande partie des lymphocytes T a besoin de co-facteurs cellulaires et/ou solubles pour exprimer correctement le 4-1BB.

Des études ont montré que la stimulation CD3 de lymphocytes T est optimale en présence de monocytes/macrophages (Musiani *et al.*, 1984; Palacios, 1985). Nous avons donc étudié le rôle de ces cellules sur l'expression du 4-1BB par les lymphocytes T. Nous avons comparé l'expression du 4-1BB sur des lymphocytes T stimulés issus de PBMC, de PBMC déplétés en monocytes/macrophages (CD14+), de T purifiés ou de T purifiés supplémentés en cellules CD14+ (fig. 3). L'expression du 4-1BB est quasiment restaurée sur des lymphocytes T purifiés stimulés en présence de cellules CD14+ (41% sur les T purifiés vs. 68% en présence de cellules CD14+). Inversement, la déplétion des PBMC en monocytes/macrophages aboutit à une diminution drastique du 4-1BB (84% sur les T issus de PBMC vs. 29% sur les T issus de PBMC déplétés en cellules CD14+) (fig. 3).

L'expression correcte du 4-1BB par les lymphocytes T semble donc dépendre de molécules de co-stimulation ou de facteurs solubles apportés par les cellules accessoires comme les

monocytes/macrophages, qui, de manière plus générale, contribuent à une réponse optimale des lymphocytes T à la stimulation CD3.

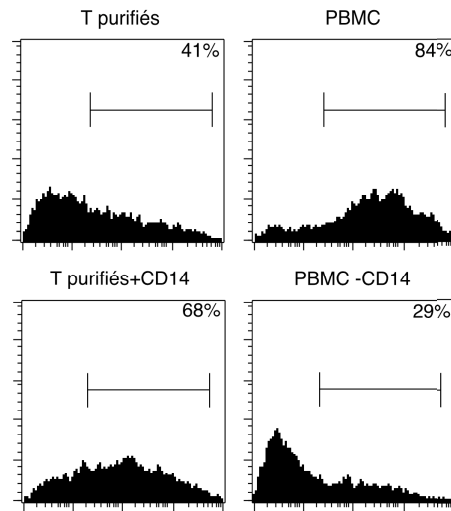


Figure 3. Expression du 4-1BB en fonction de la présence ou non des cellules CD14+ (monocytes et macrophage). Pourcentage de cellules 4-1BB+-MFI associée. Résultats représentatifs de 1 expérience sur 3.

3. Comparaison de l'expression du 4-1BB sur les sous-populations lymphocytaires T CD4 et CD8.

Les données publiées chez la souris indiquent que le 4-1BB est exprimé à la fois par les lymphocytes T CD4 et CD8 (Pollok *et al.*, 1993). Nous avons étudié l'expression du 4-1BB parmi les sous-populations lymphocytaires T CD4 et CD8 chez l'homme. Nous avons stimulé des PBMC ou des T purifiés par du CD3 et nous les avons analysés en double marquage anti-CD4 ou anti-CD8 et anti-4-1BB à 72h (fig. 4). Quelles que soient les conditions de stimulation (PBMC ou T purifiés), les CD8 expriment plus de 4-1BB que les CD4 ($82 \pm 5\%$ pour les CD8 issus de PBMC vs. $67 \pm 6\%$ pour les CD4, $p < 0,001$ et $55 \pm 8\%$ pour les CD8 issus de T purifiés vs. $22 \pm 4\%$ pour CD4, $p < 0,001$). La MFI des CD8 4-1BB+ est également supérieure (356 ± 53 pour les CD8 issus de PBMC vs. 149 ± 33 pour les CD4, $p < 0,001$ et 111 ± 17 pour les CD8 issus de T purifiés vs. 64 ± 12 pour les CD4, $p > 0,05$).

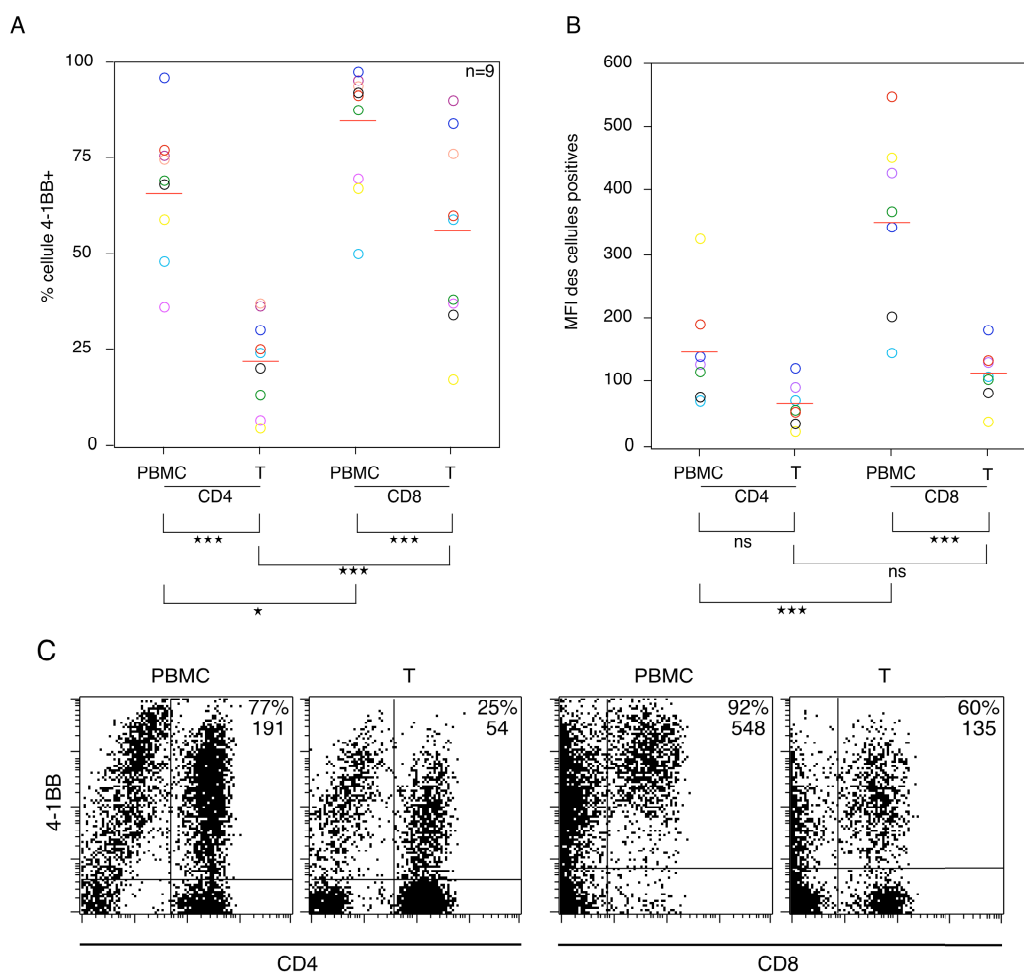


Figure 4. Répartition de l'expression du 4-1BB à la surface des sous-populations T CD4 et CD8. A et B. Représentation de l'ensemble des donneurs testés (pourcentage de cellules positives et MFI associée). L'analyse statistique est réalisée par une ANOVA suivie d'un test de Bonferroni apparié (***: $p < 0,001$ et *: $p < 0,01$). B. Exemple d'un donneur représentatif. Les chiffres en haut à droite indiquent le pourcentage de cellules double positives et leur moyenne de fluorescence.

4. Rôle des cytokines sur l'expression de 4-1BB

Nous avons montré que l'expression du 4-1BB est augmentée sur les T purifiés par la présence de monocytes/macrophages. Néanmoins, pour mettre en place un système d'amplification des lymphocytes T, il est important de déterminer des conditions d'activation qui permettent une expression du 4-1BB maximale en absence de cellules accessoires. Pour la suite de cette étude, nous avons donc entrepris de déterminer quels facteurs cytokiniques ou membranaires de co-stimulation pouvaient augmenter l'expression du 4-1BB sur les lymphocytes T CD8+ purifiés. Une étude a rapporté qu'un mélange d'IL15 et l'IL12 permet l'expression de 4-1BB par des lymphocytes naïfs de sang de cordon ombilical sans stimulation du TCR (Kim *et al.*, 2002). Nous avons donc testé le rôle de l'IL15 sur

Résultats

l'expression du 4-1BB par les T CD8 stimulés avec de l'anti-CD3 (issus d'une population T CD4 et CD8 purifiés par *RosetteSep*). Malgré des différences inter-individuelles, nous montrons que l'IL15 augmente significativement le nombre de cellules positives ($61 \pm 9\%$ sans IL15 exogène vs. $80 \pm 5,2\%$ en présence d'IL15, $p < 0,05$) (fig. 5). La MFI des cellules positives est également supérieure en présence d'IL15 (241 ± 61 sans IL15 vs. 389 ± 58 en présence d'IL15). En accord avec les résultats de Kim *et al.*, nous montrons que l'IL15 induit une légère expression du 4-1BB sur les lymphocytes T CD8 non stimulés par l'anti-CD3 ($8,3 \pm 2,2\%$ de cellules positives avec une MFI de 39 ± 7 , $p > 0,05$).

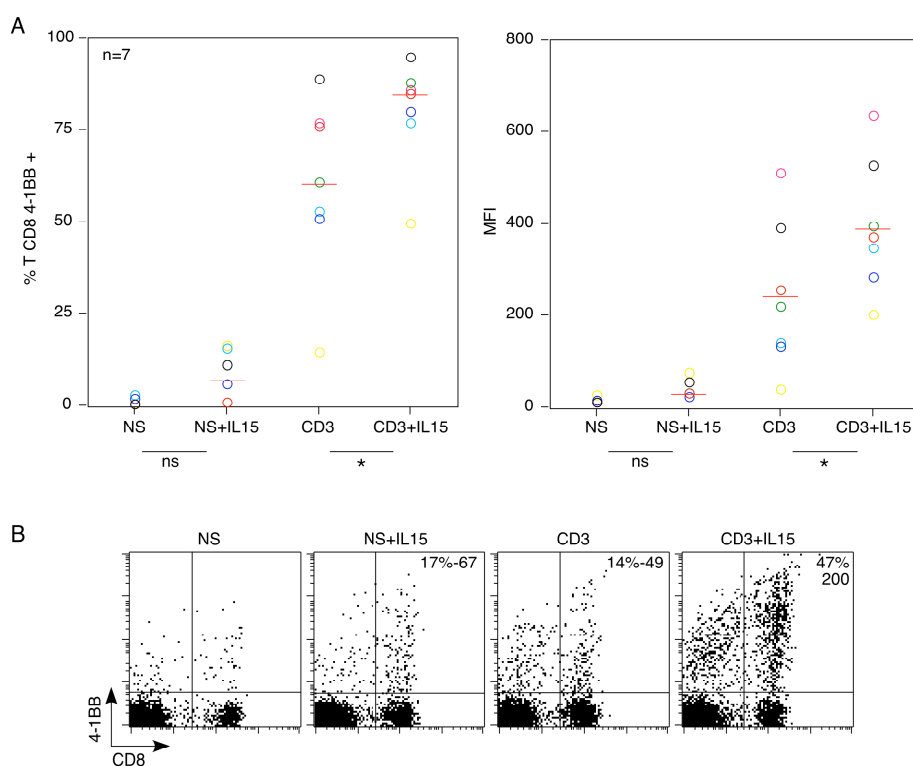


Figure 5. Analyse du rôle de l'IL15 sur l'expression du 4-1BB par les T CD8. A. Pourcentage de cellules 4-1BB positives parmi les T CD8 et MFI associée. L'analyse statistique est effectuée par une ANOVA suivie d'un test Tukey-Kramer apparié. B. Exemple d'un donneur représentatif. Les nombres en haut à droite représentent le pourcentage de cellules double positives et leur moyenne de fluorescence.

Sur trois de ces donneurs, nous avons également étudié le rôle de l'IL12 seule ou associée à l'IL15 sur l'expression du 4-1BB par les lymphocytes T CD4 et CD8 (tableau I). L'IL12 seule n'a pas d'effet sur l'expression du 4-1BB ni par les lymphocytes T CD8 ($60,9 \pm 22,3\%$ sans cytokine vs. $64,7 \pm 21\%$ en présence d'IL12) ni par les lymphocytes T CD4 ($26,3 \pm 11,2\%$ sans cytokine vs. $21,5 \pm 10\%$ en présence d'IL12). Elle ne renforce pas le rôle de l'IL15 sur

Résultats

l'expression du 4-1BB par les lymphocytes T CD8 ($76 \pm 12,7\%$ en IL15 seule vs. $74,7 \pm 11,7\%$ en IL15+IL12). Sur les lymphocytes T CD4, elle a plutôt tendance à inhiber l'action de l'IL15 ($34,7 \pm 11,2\%$ en IL15 vs. $27,3 \pm 10,2\%$ en IL15+IL12). Néanmoins, du fait d'un trop faible nombre d'échantillons, l'analyse statistique ne permet pas de conclure à des différences significatives entre les conditions.

		T CD 8					
		NS	NS+ IL15	CD3	CD3+ IL15	CD3+ IL12	CD3+ IL15/12
DO 1	% positifs(MFI)	0,1%	26,7%(54)	89,7%(390)	95,2%(462)	90%(273)	93%(217)
DO 2	% positifs(MFI)	0%	-	76%(256)	81%(427)	81%(274)	78%(207)
DO 3	% positifs(MFI)	0,3%	20%(58)	17%(39)	52%(167)	23%(83)	53%(143)
Moyenne(%)\pmSEM		0,13\pm0,09%	23,50\pm3,50%	60,90\pm22,30%	76\pm12,66%	64,67\pm20,99%	74,67\pm11,66%

		T CD 4					
		NS	NS+ IL15	CD3	CD3+ IL15	CD3+ IL12	CD3+ IL15/12
DO 1	% positifs(MFI)	0,2%	3%(34)	37,2%(90)	50%(95)	36%(82)	41%(37)
DO 2	% positifs(MFI)	0 %	-	37,8%(72)	43%(93)	33%(70)	33,5%(71)
DO 3	% positifs(MFI)	0,4%	1%(18)	4%(24)	11%(52)	4,5%(25)	7,3%(73)
Moyenne(%)\pmSEM		0,2%\pm0,11%	2%\pm1%	26,33%\pm11,16%	34,67%\pm12,00%	24,50%\pm10,04%	27,27%\pm10,21%

Tableau 1. Effet de l'IL15 et de l'IL12 sur l'expression du 4-1BB par les lymphocytes T purifiés.

Dans ce modèle de stimulation, l'IL15 est donc un des facteurs qui permet d'augmenter l'expression du 4-1BB par les lymphocytes T purifiés.

5. Expression du 4-1BB selon le statut CD28 des T CD8.

L'étude menée par Kim *et al.* concernait des lymphocytes T naïfs de sang de cordon ombilical qui sont CD28+ à 100%. Au cours de la différenciation, les lymphocytes T perdent progressivement l'expression du CD28. Nous avons donc voulu étudier s'il y avait des différences d'expression du 4-1BB en fonction du statut CD28 des cellules. Pour nous affranchir de la population T CD4, nous avons isolé les lymphocytes T CD8 par tri positif (Miltenyi).

A J0, les T CD8 des 3 donneurs étudiés étaient CD28+ à 66% (DO 1), 67% (DO 2) et 90% (DO 3). Ce pourcentage n'a pas été diminué par la stimulation CD3.

Résultats

Au bout de 72h, l'expression du 4-1BB est préférentielle sur les CD28⁻ par rapport aux CD28⁺ (97% vs. 69% pour le DO 1, 86% vs. 42% pour le DO 2 et 58% vs. 50% pour le DO 3, moyenne \pm SEM : 80,3 \pm 11,6% pour les CD28⁻ et 53,6 \pm 8% pour les CD28⁺) (fig. 6 et tableau II).

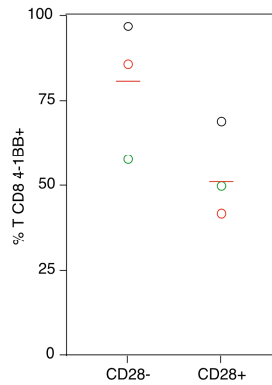


Figure 6. Expression préférentielle du 4-1BB sur les CD28⁻ (pourcentage de cellules positives). Cette étude a été menée sur des T CD8 purifiés stimulés pendant 72h par de l'anti-CD3 puis analysés par double marquage 4-1BB/CD28.

Nous montrons donc que la stimulation CD3 permet une expression correcte du 4-1BB sur les lymphocytes CD28⁻ sans ajout d'autres facteurs. Afin de déterminer les conditions optimales d'expression du 4-1BB sur les lymphocytes T CD28⁺, nous avons testé l'effet d'une stimulation supplémentaire par de l'anti-CD28, associée ou non à de l'IL15.

La stimulation par de l'anti-CD28 augmente significativement le pourcentage de cellules 4-1BB positives parmi les CD28⁺ (53,7 \pm 8% par une stimulation CD3 vs. 82,6 \pm 1,5% par une stimulation CD3/CD28, $p < 0,01$), et elle est sans effet sur les lymphocytes CD28⁻ (80,3 \pm 11,6% par une stimulation CD3 vs. 83 \pm 10,3% par une stimulation CD3/CD28) (fig. 7 et tableau II).

L'analyse selon le statut CD28 montre que l'addition d'IL15 augmente le pourcentage de lymphocytes 4-1BB⁺ à la fois sur les CD28⁺ (53,7 \pm 8% en absence d'IL15 vs. 77,3 \pm 2,7% en présence d'IL15, $p < 0,05$) et sur les lymphocytes T CD28⁻ (80,3 \pm 11,6% en absence d'IL15 vs. 94,3 \pm 3,7% en présence d'IL15, ns) (fig. 7 et tableau II).

La combinaison de la co-stimulation CD28 et de l'addition d'IL15 permet d'obtenir que la quasi-totalité des lymphocytes T CD28⁺ expriment le 4-1BB (90,7 \pm 2%) (fig. 7 et tableau II).

Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'en l'absence de stimulation CD3, l'IL15 augmente surtout l'expression de 4-1BB sur les CD28⁻ ($n=2$).

Résultats

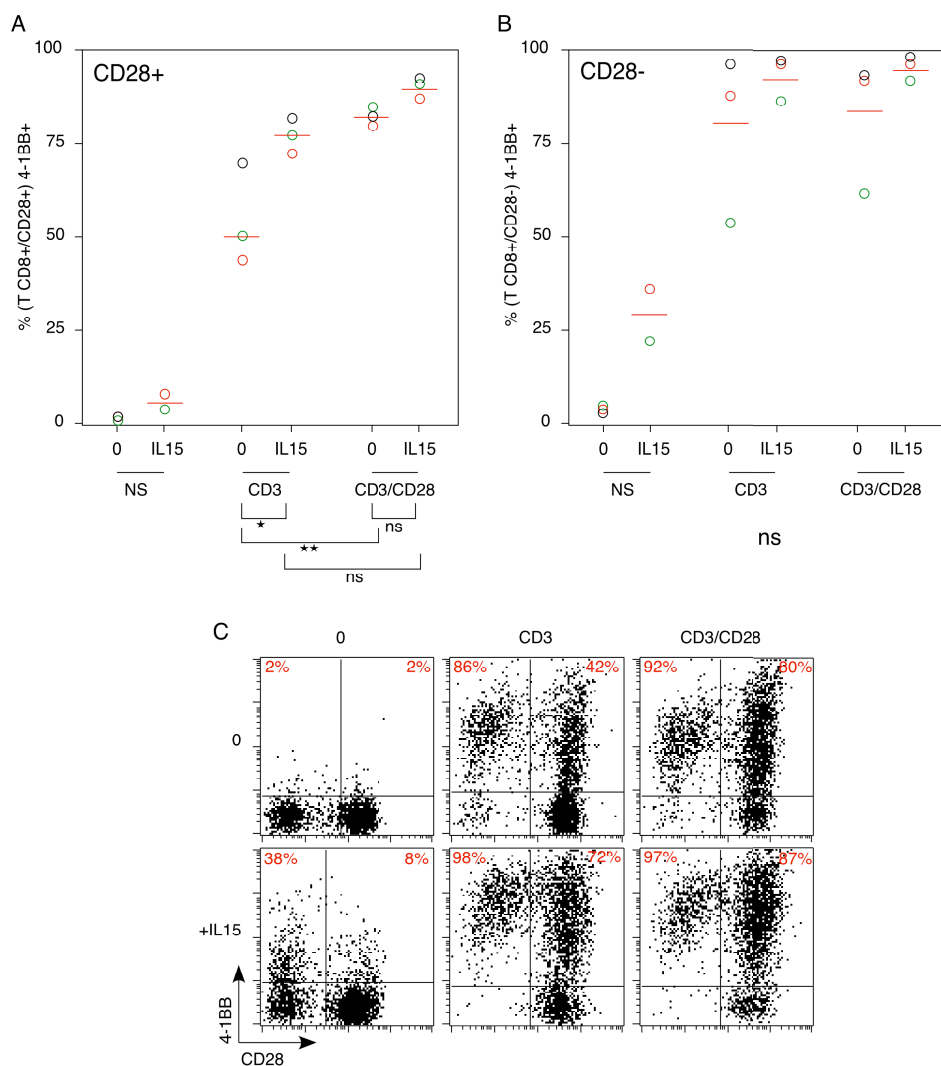


Figure 7. Expression du 4-1BB sur les T CD8+ selon le statut CD28 et selon les conditions de stimulations. A. CD28+ (★: $p<0,01$ et ★★: $p<0,05$). B. CD28-. C. Exemple d'un donneur. Les chiffres représentent le pourcentage de cellules double positives.

CD28+	NS		CD3		CD3/CD28	
	0	IL15	0	IL15	0	IL15
DO 1	1,9%	nd	69%	82%	83%	93%
DO 2	1,8%	8%	42%	72%	80%	87%
DO 3	1,1%	3,9%	50%	77%	85%	92%
Moyenne±SEM	1,6±0,25%	5,95±1,7%	53,7±8%	77,3±2,7%	82,6±1,5%	90,7±2%

CD28-	NS		CD3		CD3/CD28	
	0	IL15	0	IL15	0	IL15
DO 1	4%	nd	97%	98%	94%	99%
DO 2	2%	38%	86%	98%	92%	97%
DO 3	3%	25%	58%	87%	62,5%	93%
Moyenne±SEM	3±0,6%	31,3±5,5%	80,3±11,6%	94,3±3,7%	83±10,3%	96,2±1,9%

Tableau II. Pourcentage des cellules CD8+/CD28+/4-1BB+ selon les différentes conditions de stimulation : ensemble des résultats obtenus.

B. Conclusions et perspectives

Cette étude avait pour but de déterminer les conditions optimales d'expression du 4-1BB par les lymphocytes T CD8. Le 4-1BB est une molécule de co-stimulation inductible suite à une stimulation du TCR, et nous avons choisi un modèle d'activation polyclonale des lymphocytes T par de l'anti-CD3. Nous avons montré que l'expression du 4-1BB est maximale environ 72h après le début de la stimulation et que les lymphocytes T CD8 expriment plus de 4-1BB que les lymphocytes T CD4.

Nos résultats montrent que l'expression du 4-1BB dépend de la bonne activation des lymphocytes T : la stimulation de PBMC permet une meilleure expression que la stimulation de lymphocytes T purifiés. Des études antérieures ont établi que la présence de monocytes/macrophages était nécessaire à l'activation correcte des lymphocytes en réponse à l'anti-CD3 (Musiani *et al.*, 1984; Palacios, 1985). Nous avons confirmé que les cellules CD14+ pouvaient augmenter l'expression de 4-1BB sur les lymphocytes T.

Pour la suite de ce travail, il était cependant important de déterminer des conditions de stimulation permettant d'obtenir l'expression la plus forte possible de 4-1BB en partant de lymphocytes T purifiés. Dans ces conditions, nous avons montré que les lymphocytes CD28- exprimaient mieux le 4-1BB que les lymphocytes CD28+. Les lymphocytes CD28+ représentent une population hétérogène, constituée majoritairement de lymphocytes T naïfs. Il est donc probable qu'une stimulation CD3 ne suffise pas à activer correctement ces cellules. De fait, une co-stimulation par de l'anti-CD28 augmente l'expression du 4-1BB par les lymphocytes T CD28+. Ces résultats sont en accord avec des données publiées pendant que nous menions cette étude (Bukczynski *et al.*, 2003). Parallèlement, en nous appuyant sur les résultats de Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2004), nous avons montré que l'IL15 est un des facteurs qui augmente significativement l'expression du 4-1BB par les lymphocytes T CD28+ et CD28- activés. De plus, nous avons noté que l'IL15 délivrée en l'absence de stimulation du TCR induisait une expression non négligeable (30%) de 4-1BB à la surface des lymphocytes T CD28-. Ces résultats, qui nécessitent d'être élargis à un plus grand nombre de donneurs, pourraient refléter un des mécanismes par lesquels l'IL15 participe au maintien en survie des lymphocytes T mémoires.

Résultats

Nous envisageons de poursuivre cette étude en étudiant le rôle des cytokines comme l'IL7 et l'IL21 sur l'expression du 4-1BB par les lymphocytes T CD8. Conjointement au CD28, il serait également informatif d'analyser l'expression du 4-1BB en fonction de l'expression des marqueurs CD45RA et RO afin de distinguer plus précisément les sous-populations naïves et mémoires.

II. PRODUCTION, PURIFICATION ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET FONCTIONNELLE D'UN 4-1BBL CHIMERIQUE : AVITAG-4-1BBL

PRODUCTION OF RECOMBINANT HUMAN TRIMERIC CD137L (4-1BBL):

CROSSLINKING IS ESSENTIAL TO ITS T CELL CO-STIMULATION ACTIVITY

Catherine Rabu, Agnès Quémener, Yannick Jacques, Klára Echasserieu, Patricia Vusio, François Lang.

Article soumis au *Journal of Biological Chemistry*

A. Résumé

L'interaction du 4-1BBL (CD137L), un membre de la famille du TNF, avec son récepteur 4-1BB fournit un signal de co-stimulation et de survie aux lymphocytes T. Cependant, la structure du 4-1BBL n'est pas identifiée, et la plupart des études ont été menées à l'aide d'anticorps anti 4-1BB ou de lignées transfectées par le 4-1BBL. Il n'existe en effet que deux publications relatant l'utilisation de 4-1BBL recombinant murin, qui présente une faible homologie avec le ligand humain (36%). De plus, aucuns des 4-1BBL recombinants disponibles dans le commerce ne sont décrits comme étant capables de co-stimuler des lymphocytes T.

Nous décrivons ici la production d'un 4-1BBL humain recombinant chimérique (AviTag 4-1BBL) original d'une part du fait de la conservation de l'ensemble du domaine extracellulaire, comprenant le domaine d'homologie au TNF (THD) et la queue de 43 acides aminés courant jusqu'à la membrane et d'autre part du fait de l'adjonction d'une séquence AviTag permettant une biotinylation enzymatique de la molécule et une multimérisation via la streptavidine. Nous montrons que l'AviTag-4-1BBL s'associe en homotrimère, alors que la forme commerciale de 4-1BBL couplée à un peptide FLAG demeure principalement sous forme de monomère, ce qui résulte en une affinité de l'AviTag-4-1BBL pour le 4-1BB très supérieure à celle du FLAG4-1BBL (1,2nM vs. 55,2nM, par BiaCore). De plus, l'unique cystéine du domaine extracellulaire, située dans la queue, permet la formation d'un pont disulfure entre deux monomères constituant le trimère d'AviTag-4-1BBL. Ce pont disulfure

est présent physiologiquement dans le 4-1BBL exprimé par les cellules. La mutation de cette cystéine n'altère pas la capacité de la protéine à se trimériser, mais augmente la constante de dissociation de l'AviTag-4-1BBL pour le 4-1BB, suggérant que le pont disulfure stabilise le complexe.

Nous montrons également que l'AviTag-4-1BBL utilisé sous forme soluble inhibe significativement la prolifération des cellules mononucléées du sang périphérique stimulées par de l'anti-CD3 (OKT3). La forme mutée inhibe également cette prolifération, mais significativement moins que la forme native de part sa moins grande stabilité en solution. En revanche, l'AviTag-4-1BBL (natif et muté) entraîne une forte co-stimulation des lymphocytes T purifiés lorsqu'il est ponté par la streptavidine. De plus, nous montrons que le degré de multimérisation minimum nécessaire à l'activité du 4-1BBL est de deux trimères.

Nous disposons donc de 4-1BBL recombinant humain bien caractérisé biochimiquement, fonctionnel, qui permet de moduler différenciellement la réponse immunitaire T selon sa forme d'utilisation.

Production of Recombinant Human Trimeric CD137L (4-1BBL) CROSS-LINKING IS ESSENTIAL TO ITS T CELL CO-STIMULATION ACTIVITY*

Received for publication, June 24, 2005, and in revised form, August 31, 2005 Published, JBC Papers in Press, October 4, 2005, DOI 10.1074/jbc.M506881200

Catherine Rabu[†], Agnès Quémener[‡], Yannick Jacques[‡], Klara Echasserieu[‡], Patricia Vusio[§], and François Lang^{‡1}

From [†]INSERM U601 and [§]IFR26, 9 quai Moncousu, 44035 Nantes Cedex, France

The interaction between 4-1BB ligand (CD137L), a member of the tumor necrosis factor superfamily, and its receptor 4-1BB provides a co-stimulatory signal for T lymphocyte proliferation and survival. However, the structure of 4-1BBL has not been thoroughly investigated, and none of the human recombinant 4-1BBL molecules available have been described as capable of co-stimulating T cells. The present work provides a model of the three-dimensional structure of the tumor necrosis factor homology domain of 4-1BBL and describes the production of a recombinant human soluble 4-1BBL whose originality lies in that it contains the whole extracellular tail preceding the tumor necrosis factor homology domain and an AviTag peptide (AviTag-4-1BBL) allowing enzymatic biotinylation and multimerization via streptavidin. We provide evidence that this chimeric protein exists as a homotrimer, whereas commercial FLAG-tagged 4-1BBL does not. This resulted in a much higher affinity for 4-1BB (1.2 nM) as compared with FLAG-4-1BBL (55.2 nM). We demonstrate that the single extracellular cysteine residue in the tail (Cys-51) could form a disulfide bond, both in our recombinant protein and in physiologically expressed 4-1BBL. The mutation of this cysteine residue exerted no effect on trimerization but increased the dissociation rate of AviTag-4-1BBL from 4-1BB. In its soluble form, AviTag-4-1BBL did not stimulate purified T cells but dramatically inhibited proliferation of peripheral blood mononuclear cells stimulated with anti-CD3 mAb. In contrast, a very significant co-stimulatory effect was observed on purified T cells once AviTag-4-1BBL was immobilized onto streptavidin beads. In addition, we show that the cross-linking of two trimeric AviTag-4-1BBL molecules was the minimum step required to elicit significant costimulatory activity.

4-1BBL (CD137L), a type II glycoprotein belonging to the tumor necrosis factor superfamily, was first characterized in the mouse (1) and then in humans (2). Its expression on various antigen-presenting cells such as B cells, monocytes, and splenic dendritic cells as well as on T lymphocytes is induced upon stimulation (for review see Ref. 3). 4-1BBL interacts with 4-1BB, expressed almost exclusively on T cells following T cell receptor stimulation (4), leading to T cell proliferation and cytokine production. 4-1BB ligation also promotes T cell survival and inhibits apoptosis via the induction of the anti-apoptotic molecule Bcl-X_L (5, 6). Although CD28/B7 interactions play a key role in the early phases of antigen recognition, 4-1BBL stimulation seems to be implicated at a later stage in the primary immune response and during antigen re-exposure (7). Moreover, a report by Melero *et al.* (8) highlighted the

importance of 4-1BB/4-1BBL interactions in anti-tumor immunity by showing that the administration of agonistic anti-4-1BB to the mouse resulted in dramatic tumor regressions, even in weakly immunogenic tumors.

Considering the growing interest in studying 4-1BB stimulation in T cell expansion, activation, and survival, it is surprising that only two reports have described the use of recombinant 4-1BBL (9, 10) and that it was mouse 4-1BBL that significantly differed from human 4-1BBL (only 36% homology at the protein level) in both cases. In fact, most of the *in vitro* and *in vivo* studies have been performed either with a stimulatory anti-4-1BB mAb (8, 11, 12) or with cells transfected with 4-1BBL cDNA (13–15). In addition, despite different recombinant human 4-1BBLs being commercially available today (Alexis, Chemicon, Ancell), they are poorly characterized from a biochemical point of view, and none of them are described as being able to co-stimulate T lymphocytes. As a result, little evidence has been available to date in the literature concerning the structure of 4-1BBL and its organization necessary to achieve T cell co-stimulation. For this reason, we set out to produce a soluble form of human 4-1BBL to determine its structure, its binding characteristics toward 4-1BB and to evaluate its functional activity.

MATERIALS AND METHODS

Sequence Alignment and Molecular Modeling—Sequences were obtained from the Swiss-Prot data base. Sequence alignment of selected templates was firstly deduced from a pairwise structure alignment automatically generated by the CE (16) and FSSP (17) programs. The 4-1BBL sequence was then manually aligned with the template multi-alignment according to conserved amino acids and predicted β -strand structure. Homology modeling was performed with the Modeler module of InsightII (18) using the x-ray crystallographic structure of mouse TNF α ,² mouse RANKL, human CD40L, and human APO2L (Protein Data Bank codes 2TNF, 1IQA, 1ALY and 1DG6 respectively). Loop refinement of selected models was performed with the refined loop Modeler program. An evaluation of the generated models was performed using the Verify-3D (19), ProsaII (20), and Procheck (21) programs. Energy minimization was then carried out with the CHARMM module of Insight and CHARMM forcefield (22) in a four-step procedure (1, all atoms fixed except hydrogen; 2, backbone fixed; 3, backbone of strand structure fixed; 4, all atoms free) using the 100 steepest descent steps followed by conjugate gradient steps, until a convergence gradient of 0.001 was attained. The energy scores provided by ProsaII and the global compatibility score given by Verify-3D were in accordance with those of the templates. Furthermore, the stereochemical quality of the selected predicted model, as evaluated by Procheck, compares favorably with the template. The Ramachandran plot showed 97.7% residues in allowed regions. The protein molecular surface of the selected model was defined using a solvent probe radius of 1.4 Å and continuum elec-

* This work was supported by Grant RO3030GG from the "Ligue Nationale contre le Cancer." The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ To whom correspondence should be addressed: Inserm U601, Institut de biologie, 9 quai Moncousu, F-44035 Nantes Cedex, France. Fax: 33-240-356697; E-mail: francois.lang@univ-nantes.fr.

² The abbreviations used are: TNF α , tumor necrosis factor α ; BS³, bis(sulfosuccinimidyl)-suberate; WT, wild type; PE, phycoerythrin; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; THD, TNF homology domain.

trostatic calculations were performed with the DELPHI package (23, 24) under Insight. The formal charge set was used, with an ionic strength of 0, and the dielectric constants of the protein and the surrounding medium were, respectively, 2 and 80. In addition, the electrostatic potentials were mapped onto cubic grids with a 0.72-Å point spacing. The percentage grid fill was 50% for 4-1BBL (129 × 129 × 129 points/slide), and the boundary potential was full coulombic. Following this, the linear Poisson-Boltzmann equation was solved iteratively, and the Engelman-Steitz scale was used to display protein surface hydrophobicity (25).

Production of AviTag-4-1BBL as Inclusion Bodies in Bacteria—The cDNA encoding the whole extracellular domain of 4-1BBL was obtained by reverse transcriptase PCR amplification of T2 hybridoma RNA prepared using TRIzol® (Invitrogen). Single-stranded cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using poly(dT) primers and M-MLV RT (200 UI, Invitrogen). The extracytoplasmic domain of 4-1BBL was amplified by PCR using the following primers: 5'-CGG-GATCCCTCGCCTGCCCTGGGCC-3' and 5'-GCTCTAGAT-TATTCGACCTCGGTGA-3' (MWG-Biotech, France). The AviTag sequence (Avidity) TCCGGCCTGAACGACATCTTCGAGGCT-CAGAAAATCGAATGGCACGAA (MSGLNDIFEAQKIEWHE) was ligated to the 5'-end of 4-1BBL cDNA, and the whole construct was inserted into the pET24a production vector (Invitrogen). AviTag-4-1BBL was produced as inclusion bodies in *Escherichia coli* BL21(DE3) strain. The AviTag-4-1BBL protein (10 mg) was allowed to refold in 500 ml of folding buffer (0.4 M arginine, 100 mM Tris, pH 8, 2 mM EDTA, pH 8, 5 mM GSH, 0.5 mM GSSG, 0.005% Tween 20, and a protease inhibitor mixture (Complete, Roche Diagnostics) slowly stirred for 72 h at 4 °C under slow agitation, before concentration on a 10-kDa cut-off membrane (Millipore). Biotinylation was performed using biotin protein ligase (Avidity) in compliance with the manufacturer's instructions. After removal of free biotin on HiPrep desalting, AviTag-4-1BBL was purified by gel filtration on Superdex 200 HR 16/60 (Amersham Pharmacia Biotech). The mutation of AviTag-4-1BBL C51S was performed with 5'-GATCCCTCGCCTCCCCCTGGGCCGT-3' and 5'-ACGGC-CCAGGGGGAGGCGAGGGATC-3' primers, using a QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) in accordance with the manufacturer's instructions. Production was performed as described above.

Production of AviTag-4-1BBL in the Insect Cell Line S2—To allow secretion of AviTag-4-1BBL protein by S2 *Drosophila* cells, the cDNA coding for the IL6 signal peptide was added to the 5'-end of the bacterial construct, and the whole construct was subcloned in the pRmHa-3 expression vector which carries a copper-inducible promoter (a kind gift from Dr. Goldstein). S2 cells were co-transfected with the pRmHa-3 and pCoblast, which carries blasticidin resistance using the CaCl₂ method and selected with blasticidin over a period of 3 weeks (25 µg/ml, Invitrogen). The bulk culture of blasticidin-resistant cells was cloned by limiting dilution using non-transfected irradiated S2 *Drosophila* cells as a feeder. Clones were assayed for AviTag-4-1BBL production by intracytoplasmic staining with an anti-4-1BBL monoclonal Ab (BD Biosciences). Clone 1 was grown to a concentration of 5.10⁶/ml in a serum-free culture medium (Invitrogen), and protein production was induced by the addition of 0.75 mM CuSO₄ for 5 days at 27 °C. The supernatant was concentrated on a VivaFlow concentrator cell, separated on a DEAE column, and biotinylated as described above. The protein was finally purified by anion exchange chromatography on a MonoQ HR 10/10 column (Amersham Pharmacia Biotech). FLAG-4-1BBL was purchased from Alexis.

SDS-PAGE and Western Blot Analysis of 4-1BBL Proteins—Recombinant 4-1BBL proteins and native membrane 4-1BBL were analyzed by

SDS-PAGE (12% acrylamide gels). Gels were stained with saturated Coomassie Blue R250 (Sigma) when appropriate. For immunoblotting, proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P, Millipore). AviTag-4-1BBL was detected with 1 µg/ml of a goat anti-4-1BBL polyclonal Ab (Santa Cruz Biotechnology) followed by a horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-goat Ab (1:15,000, Santa Cruz Biotechnology). Revelation was performed by ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

In certain cases, proteins were cross-linked prior to Western blotting using the non-reversible, homobifunctional, and water-soluble cross-linking agent BS³ (Pierce). BS³ (10 mM in water) was then added to 40 pmol of protein, to give the required final concentration (125–500 µM) and cross-linking was allowed to take place for 1 h at room temperature. The reaction was quenched with 1 M Tris, pH 7.5.

For the analysis of native 4-1BBL, membrane proteins were extracted from T2 cells using Triton X-114 as previously described (26). Briefly, 60 × 10⁶ T2 cells were lysed with 1 ml of lysis buffer (10 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-114 (Sigma) and a protease inhibitor mixture (Complete, Boehringer) for 30 min on ice. The lysate was centrifuged at 900 × g for 10 min to remove cell debris and nuclei, and overlaid on an ice-cold sucrose cushion (6% w/v sucrose, 10 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.06% Triton X-114). A clouding of the solution occurred after a 3-min incubation at 30 °C. The tube was then centrifuged for 3 min at 300 × g at room temperature to recover the detergent phase as an oily droplet from the bottom of the tube. The detergent phase enriched in membrane proteins was precipitated by MEOH/CHCl₃ 4:1 (v/v) before loading onto a 12% SDS-PAGE and immunoblotting as described above.

Surface Plasmon Resonance Analyses—Binding experiments of the different recombinant 4-1BBL proteins to a recombinant human 4-1BB-Fc chimera (R&D Systems) were performed with a BIAcore 2000 optical biosensor (BIAcore AB, Uppsala, Sweden). The human 4-1BB/Fc protein was covalently coupled to a carboxymethyl dextran flow cell (CM5 BIAcore) as recommended by the manufacturer. The level of immobilization was set at 500 resonance units. The binding of purified mutant and native 4-1BBL was assayed at 25 °C with concentrations ranging from 0.725 to 72.46 nM at a flow rate of 40 µl/min in HBS-EP buffer (0.01 M HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% surfactant P20). Association was monitored for 5 min before initiating the dissociation phase for another 10 min with HBS-EP buffer. The flow cells were regenerated by a 1-min pulse with 10 mM glycine-HCl at pH 1.8. The resulting sensorgrams were analyzed using the BIA Evaluation software 3.2 (BIAcore AB).

Multimerization of the Different Recombinant 4-1BBLs—AviTag-4-1BBL (wild type (WT) and C51S) was coated onto M280 streptavidin magnetic beads by incubating decreasing concentrations of biotinylated proteins (ranging from 10 µg/ml to 5 ng/ml) with 67.10³ M280 magnetic microbeads (DynaL Biotech) for 2 h at room temperature under continuous agitation. The FLAG-4-1BBL was coated in the same conditions using M280 tosylactivated magnetic beads covalently linked to an anti-FLAG mAb (clone M2, Sigma). The saturation of the beads was checked by flow cytometry using either a mouse monoclonal PE-conjugated anti-4-1BBL (clone C65-485, BD Biosciences) or a goat anti-4-1BBL polyclonal Ab followed by an adsorbed fluorescein isothiocyanate-conjugated donkey anti-goat Ab as a secondary reagent (Serotec). Saturation, estimated by the fluorescence plateau, was obtained with 0.5 pg/bead of AviTag-4-1BBL and 2 pg/bead of FLAG-4-1BBL.

Tetramerization with streptavidin is usually attained by mixing streptavidin (Sigma) and AviTag-4-1BBL at a molecular ratio of 1:4 for 1 h at room temperature. To obtain a mixture of the different multimers

(tetramers, trimers, dimers, and monomers) AviTag-4-1BBL was incubated with a molar excess of streptavidin, and the different forms were then separated by gel filtration.

Cell Isolation and Functional Assays—Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors were isolated by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation and resuspended in RPMI medium (Sigma) supplemented with 1% L-glutamine and 8% human serum. Purified T cells were obtained from fresh blood by negative selection using a RosetteSep isolation kit (StemCell Technologies). The purity of the T lymphocyte preparation was checked by flow cytometry with a fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD3 mAb (BD Biosciences) and was always above 95%. T lymphocytes (10^5 /well, flat bottom 96-well plates, Falcon) were stimulated for 72 h with biotinylated anti-CD3 mAb (clone UCHT1, BD Biosciences) immobilized on M280 streptavidin magnetic beads. OKT3 (Orthoclone) immobilized in flat bottom 96-well plates was used to stimulate PBMC (10^5 /well) overnight at 4 °C in phosphate-buffered saline instead of anti-CD3-coated beads, because macrophages tended to engulf the beads. All 4-1BB ligands were added after 6 h of CD3 stimulation to allow the induction of 4-1BB expression on T lymphocytes. Proliferation was estimated by measuring the incorporation of tritiated thymidine in quadruplicate samples during the last 16 h of culture.

The binding of the different recombinant 4-1BBLs to CD3-activated or resting T lymphocytes was evaluated after 48 h. Staining was performed at room temperature for 1 h using either PE-conjugated anti-4-1BB mAb (clone 4B4-1, BD Biosciences), AviTag-4-1BBL at 10 μ g/ml revealed by PE-conjugated streptavidin at 0.5 μ g/ml or FLAG-4-1BBL at 10 μ g/ml revealed with a combination of mouse anti-FLAG mAb (10 μ g/ml) and a fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse F(ab')₂ Ab (10 μ g/ml). Staining of 4-1BBL on the T2 hybridoma was performed using PE-conjugated anti-4-1BBL (clone C65-485) for 45 min at 4 °C. Flow cytometry was performed on a FacScan (BD Biosciences) and analyzed with the CellQuest Pro software (BD Biosciences).

Statistical Analysis—Results are expressed as mean \pm S.E. Results were analyzed by analysis of variance followed by either Tukey-Kramer or Dunnett post-tests. Post-tests were only performed when the analysis of variance test showed a significant difference ($p < 0.05$) between groups.

RESULTS

Modeling of the Three-dimensional Structure of 4-1BBL—4-1BBL belongs to the TNF superfamily and, as such, is presumed to be trimeric like the other members of the family (27), although no information on its three-dimensional structure has yet been provided. We thus decided to generate a model of 4-1BBL structure. We firstly performed a sequence alignment of the TNF-homology domain (THD) of human 4-1BBL with that of mouse TNF, mouse RANKL, human CD40L and human APO2L (Fig. 1A). The THD of 4-1BBL displayed a 17.6, 21.6, 17.8, and 19.5% sequence homology with TNF, RANKL, CD40L, and APO2L, respectively. With this alignment and based on x-ray structures of mouse TNF, mouse RANKL, human CD40L, and human APO2L, a model of the THD of human 4-1BBL was generated (see "Materials and Methods"). A ribbon representation of the final model is given in Fig. 1B, showing two stacked β -pleated sheets each made up of five anti-parallel β -strands that adopt the classical "jelly-roll" topology found in proteins belonging to the TNF family (27). The inner sheet (strands A, A', H, C, and F) may be involved in trimer contacts (Fig. 1B, left) and the outer sheet (strands B, B', D, E, and G) may be exposed to the solvent (27). An analysis of hydrophobicity revealed a large hydrophobic area containing

residues constituting the sheet potentially involved in trimer formation: Phe-7 and Val-11 (strand A), Val-149, Phe-153, Val-155, and Ile-159 (strand H), Val-55 and Phe-59 (strand C), Phe-112, Phe-114, Leu-118, and Leu-119 (strand F) (Fig. 1B, middle). In addition, charged residues such as Arg-65, Glu-63, and Asp-99 located close to the hydrophobic area may also contribute to trimer formation (Fig. 1B, right). A previous crystallographic analysis of the LT α /TNFR1 complex showed that loops of the trimeric ligand are particularly involved in contact with the receptor, especially loops AA', DE, EF, and CD (28). In our model, the low number of conserved residues found in those loops of 4-1BBL and the high flexibility of these regions support their implication in defining the specificity of ligand-receptor interaction.

The Extracellular Domain of 4-1BBL Forms a Trimer Containing a Disulfide Bond—To produce recombinant soluble 4-1BBL, we engineered a cDNA construct coding for the whole extracellular domain of human 4-1BBL coupled to a biotin tag, the AviTag. This construct included the 43-amino-acid long tail spanning from the membrane to the THD and thus differed from a commercially available FLAG-tagged 4-1BBL (Alexis) (Fig. 1C). It should be noted that this tail contains a cysteine residue close to the membrane.

We first produced the AviTag-4-1BBL protein with a theoretical mass of 23 kDa as inclusion bodies in *E. coli*. The purity of inclusion bodies exceeded 95%, as evaluated by SDS-PAGE and Coomassie staining (Fig. 2A). After refolding and concentration, gel filtration analysis revealed two major peaks, Peaks 1 and 2, with a molecular mass of around 140 and 70 kDa, respectively (Fig. 2B). Peak 2 was compatible with a trimeric form of AviTag-4-1BBL. SDS-PAGE electrophoresis followed by Western blotting of Peak 2 showed that the trimeric form dissociated into a monomer and a dimer. The homodimer contained a disulfide bond as demonstrated by its disappearance under reducing conditions (Fig. 3A). An analysis of Peak 1 by Western blot under reducing and non-reducing conditions showed an identical profile (not shown), suggesting that it corresponded to a multimeric complex of AviTag-4-1BBL linked by disulfide bonds. This form was discarded, as it was considered to be wrongly folded, because it turned out to be totally inactive in the functional assays described later. As expected, FLAG-4-1BBL appeared only as a monomer on SDS-PAGE because it lacks the cysteine-containing region (Fig. 3A).

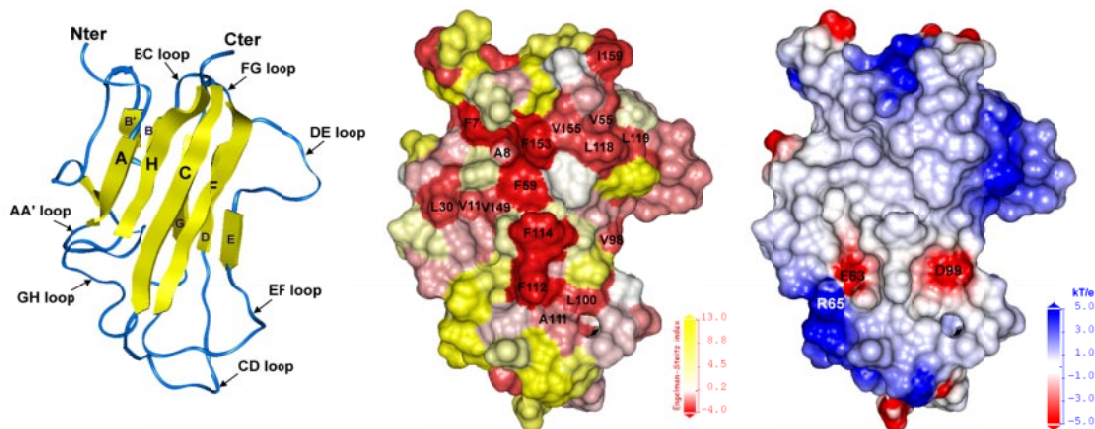
We next sought to determine whether the disulfide bond present in the trimeric form of AviTag-4-1BBL could have been artificially generated during the refolding of bacterial inclusion bodies. For this purpose, soluble AviTag-4-1BBL was produced in the *Drosophila* S2 expression system. In this system, the expressed protein is naturally processed inside the cell and then excreted into the culture medium. The analysis of AviTag-4-1BBL produced in S2 supernatants revealed a similar profile as that obtained with refolded inclusion bodies (Fig. 3B). This suggested that the disulfide bond was naturally formed in eucaryotic cells during AviTag-4-1BBL processing and export. To ascertain whether the disulfide bond was actually present in physiologically expressed 4-1BBL, Western blot analyses were performed on Triton X-114 extracts from T2 hybridoma cells that constitutively express 4-1BBL (Fig. 3C). A similar profile was obtained, with a dimeric form that could be reduced by 2-mercaptoethanol (Fig. 3D), thus pointing to the physiological nature of the disulfide bond.

Finally, we performed cross-linking experiments with BS³ on refolded AviTag-4-1BBL and FLAG-4-1BBL to visualize trimers by SDS-PAGE. Cross-linking of AviTag-4-1BBL with BS³ resulted in the appearance of bands of higher molecular mass, of which one could correspond to a trimer (around 70 kDa) and another (around 140 kDa) may represent dimers of trimers (Fig. 3E). This observation further demonstrated that

A.

	A	A'	B'	B
TNF	---SDKPV A HVVANHQVEEQ-----	L-EWLS-QRAN A LLAN--GMDLKD--	NQLVV	
RANKL	---AQPF A HLTIN--AA-----	S-IPSGSHKV T LSSWYH-DRGW A KIS N ---	/T L SN-G-KLRV	
CD40L	GDQNPQIA A HVISE--A-----	SSKT---TSVLQ-W A E-K-GYYTMS N N-LVT L EN-GK Q LTV		
APO2L	---Q R V A AHITGTR-----	/KNEKALG-----	RKINSWESSRS G HS F L S N---	LHL R N-G-ELVI
4-1BBL	-DL R QGM F A Q LVAQN-V-----	LLI---DG P LS-W Y S-D P GLAGV S L T GGLSYKEDTK E LVV		
	C	D	E	
TNF	PAD G LYLV S QV L F K GQ G -----	CP-----	DY--V L L T H T VS R FAIS Y -QE K V N LLSA V K S P	
RANKL	NQD G F Y Y L Y A NIC F R H H---	ETSGS-----	VPTD Y --L Q L/V Y V V K T SI-KIP S SH N L/K G G S T K	
CD40L	K R Q G L Y Y I Y A Q V T F C S -----	NREA--SSQA-PF I AS L CL K SP--	GR F ER I LL R A A N T H	
APO2L	HE K G F Y Y I S Q T Y F R F Q---	E---/K E N T K-----	N D K--Q M V Q Y I Y K Y T -S Y -P A P I LL M K S A R N S	
4-1BBL	AK A G V Y Y V F F Q L E L R RVVAGEG S G S -----	V S L A L H L Q L R SAAG A A L A L T V D L P P A		
	F	G	H	
TNF	CPKDT P E G A E L K ---	PW Y E P I Y L G G V F Q L E K G D Q L S A E V N L P K Y ---	L D F A E S G Q V Y F G V I A L ----	
RANKL	N-WSG-----	N S E F H F Y S I N V G G F F K L R A G E E I S I Q V S N P S L ---	L D P-D Q D A T Y F G A F K V Q-D I D	
CD40L	SSA-----	K-P- C G Q Q S I H L G G V F E L Q P G A S V F V N V T D P S Q ---	V S H--G T G T S F G L L K L ----	
APO2L	C-WS-----	K D A E Y G L Y S I Y Q G G I F E L K E N D R I F V S V T N E H L ---	I D M-D H E A S F G A F L V G ---	
4-1BBL	SS-----	E A R- N S A F G F Q G R L L H L S A G Q R L G V H L H T E A R A R H A W Q L T-Q G A T V L G L F R V T P E I-		

B.



C.

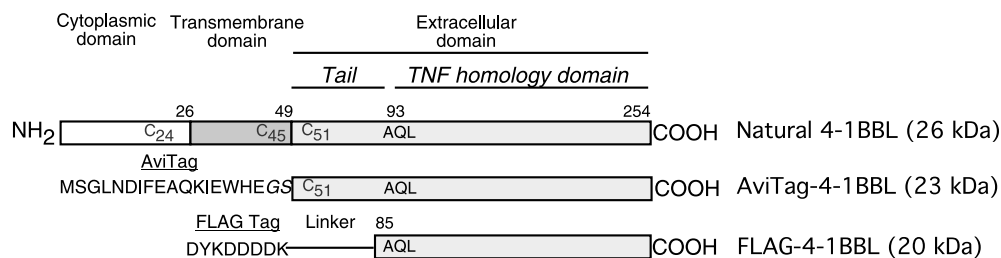


FIGURE 1. A, sequence alignment of the TNF-homology domain of human 4-1BBL, mouse TNF, mouse RANKL, human CD40L, and human APO2L. β -strands (A-H) are identified by shaded letters. Conserved amino acids (in at least three sequences) are in bold. On the RANKL sequence / indicates a missing residue in the 1TQA Protein Data Bank structure. B, molecular model of the TNF homology domain of human 4-1BBL. Left, ribbon drawing of the modeled 4-1BBL showing the various β -strands (A-H) and loops (arrow). Middle and right, the Connolly surface of modeled 4-1BBL is colored with either the hydrophobicity index of the exposed residues (hydrophobic in red, hydrophilic in yellow) (middle) or with the electrostatic potential (right). C, schematic representation of the different human 4-1BBL proteins studied. The AQL sequence corresponds to the beginning of the TNF homology domain. In the AviTag-4-1BBL protein, the entire extracellular domain of human 4-1BBL (amino acids 49–254) was coupled to a biotin tag (AviTag), whereas in FLAG-4-1BBL, the FLAG peptide (8 amino acids) was coupled to the THD through an undefined 11-amino-acid linker.

AviTag-4-1BBL refolded as a trimer. In marked contrast, cross-linking of FLAG-4-1BBL revealed no trimeric forms but only a band compatible with dimers and a strong band corresponding to large aggregates that did not penetrate into the gel (Fig. 3F). Considering that the dimeric forms probably originated from the dissociation by SDS of pre-existing and partially cross-linked trimers, our data suggest that only a very small fraction of FLAG-4-1BBL was in trimeric form (and thus undetectable as such after BS³ cross-linking), whereas most of it was monomeric.

The Disulfide Bond Stabilizes Trimeric AviTag-4-1BBL—To investigate the role of the disulfide bond in 4-1BBL structure and function, we produced a mutated AviTag-4-1BBL where cysteine was replaced by serine (C51S). Because the cysteine residue is located well outside the THD of 4-1BBL, it was anticipated that the absence of the disulfide bond would not affect trimerization but may result in a less stable trimer. As a matter of fact, C51S AviTag-4-1BBL behaved as a trimer under gel filtration after refolding and the higher molecular weight form (Peak 1)

FIGURE 2. A, SDS-PAGE and Coomassie staining of 30 μ g of inclusion bodies of WT AviTag-4-1BBL. AviTag-4-1BBL appeared as a major band around 23 kDa, the expected molecular mass of the monomer. B, gel filtration analysis of 30 μ g of refolded AviTag-4-1BBL on a S200 column. The first peak corresponded to excluded aggregates. K_{av} of the peaks are shown, and the calibration curve is shown in the inset. K_{av2} corresponded to a molecular mass around 70 kDa, compatible with trimeric 4-1BBL, whereas K_{av1} , estimated at around 140 kDa, may represent dimers of trimers.

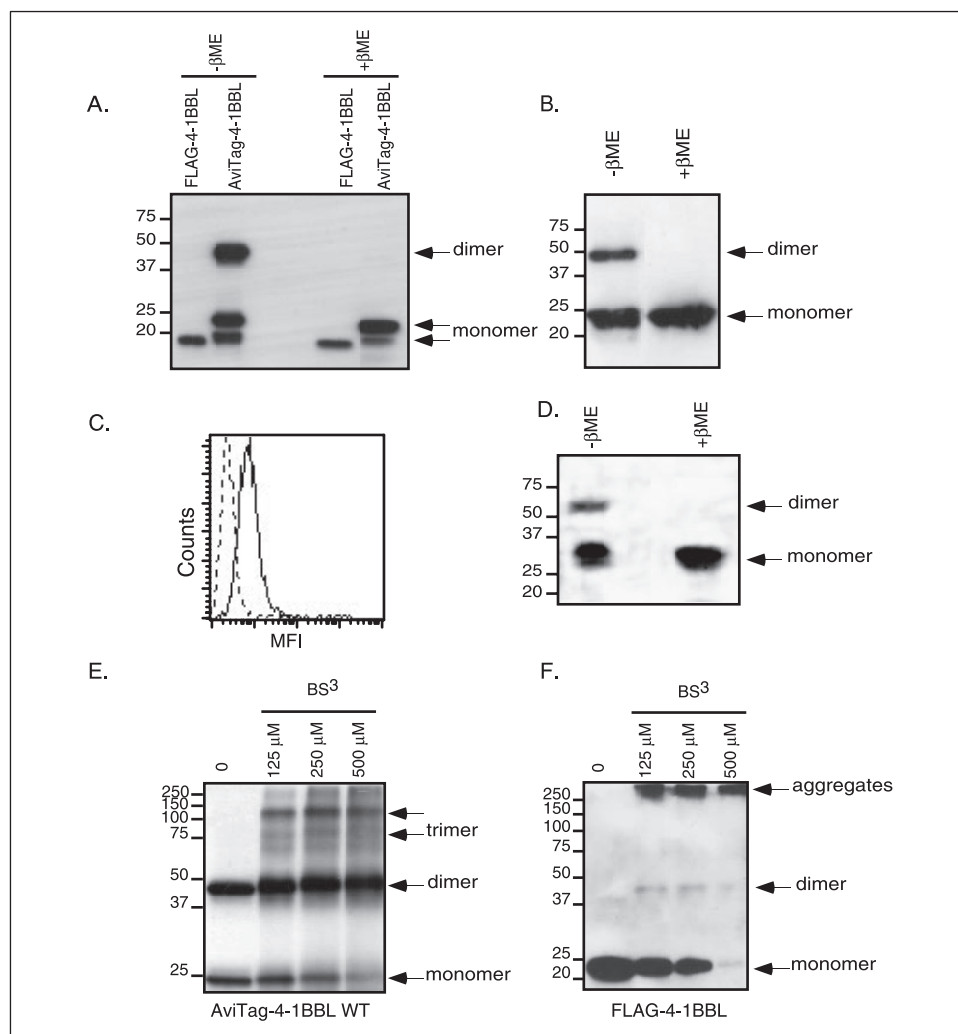
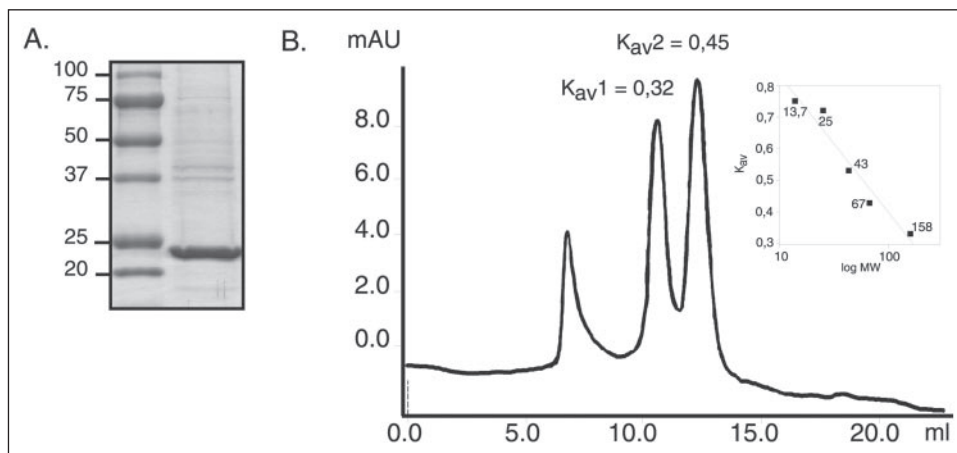


FIGURE 3. A, Western blot analysis of purified WT AviTag-4-1BBL produced in *E. coli* and FLAG-4-1BBL produced in HEK293 with a polyclonal goat anti-4-1BBL Ab. FLAG-4-1BBL appeared as a single band at the expected 20-kDa molecular mass. WT AviTag-4-1BBL dissociated into a monomer of 23 kDa and a dimer that disappeared under reducing conditions. The additional lower band represented a truncated form. B, same analysis as in A, with WT AviTag 4-1BBL produced in S2 *Drosophila* cells. Dimers containing a disulfide bond and monomers could be observed. C, analysis of 4-1BBL expression on the T2 hybridoma cell line by flow cytometry after staining with a mouse anti-4-1BBL mAb. D, same as in A with membrane-bound 4-1BBL from T2 cells. Triton X-114 extracts from 6×10^7 T2 cells were precipitated and loaded in each well. Western blot revealed the presence of a dimer containing a disulfide bond. E, same as in A, after cross-linking of WT AviTag-4-1BBL with BS³. Addition of increasing concentrations of BS³ resulted in the appearance of higher molecular weight bands compatible with trimers and possibly dimers of trimers. F, same as in E with FLAG-4-1BBL. Cross-linking generated weak dimeric forms and aggregates but no visible trimers. β ME, 2-mercaptoethanol.

previously seen with the WT AviTag-4-1BBL could not be detected (Fig. 4A). Western blot analysis after SDS-PAGE showed that under non-reducing conditions, the trimer dissociated into monomers only with no dimers being present, as expected (Fig. 4B). Cross-linking with BS³ on the other hand revealed both dimeric and trimeric forms of C51S AviTag-4-1BBL (Fig. 4C). It was therefore concluded that the disulfide bond is not required for AviTag-4-1BBL refolding as a trimer.

Using surface plasmon resonance, we proceeded to determine the kinetic constants of binding of native or mutated AviTag-4-1BBL and

FLAG-4-1BBL to immobilized 4-1BB-Fc. The sensorgrams obtained with a range of concentrations (0.1–5 μ g/ml) of each of the three proteins are shown in Fig. 5. The first striking feature observed was that FLAG-4-1BBL displayed a much lower binding affinity to 4-1BB than native or mutated AviTag-4-1BBL (K_d of 55.2 nM for FLAG-4-1BBL versus 1.2 nM for WT AviTag-4-1BBL and 2.3 nM for its C51S variant). This lower affinity mainly resulted from a 30-fold lower association rate (k_{on}) for FLAG-4-1BBL as compared with WT AviTag-4-1BBL (6.7×10^3 versus 2.1×10^5 M⁻¹s⁻¹, respectively), whereas the dissociation

FIGURE 4. A, gel filtration analysis of C51S AviTag-4-1BBL after refolding. The major peak is compatible with a homotrimer. B, Western blot analysis of C51S AviTag-4-1BBL with goat anti-4-1BBL Ab. Mutation of the cysteine abrogated dimer detection. C, cross-linking of C51S AviTag-4-1BBL with BS³ and Western blot with goat anti-4-1BBL Ab. The addition of increasing concentrations of BS³ resulted in the appearance of bands corresponding to dimers and trimers.

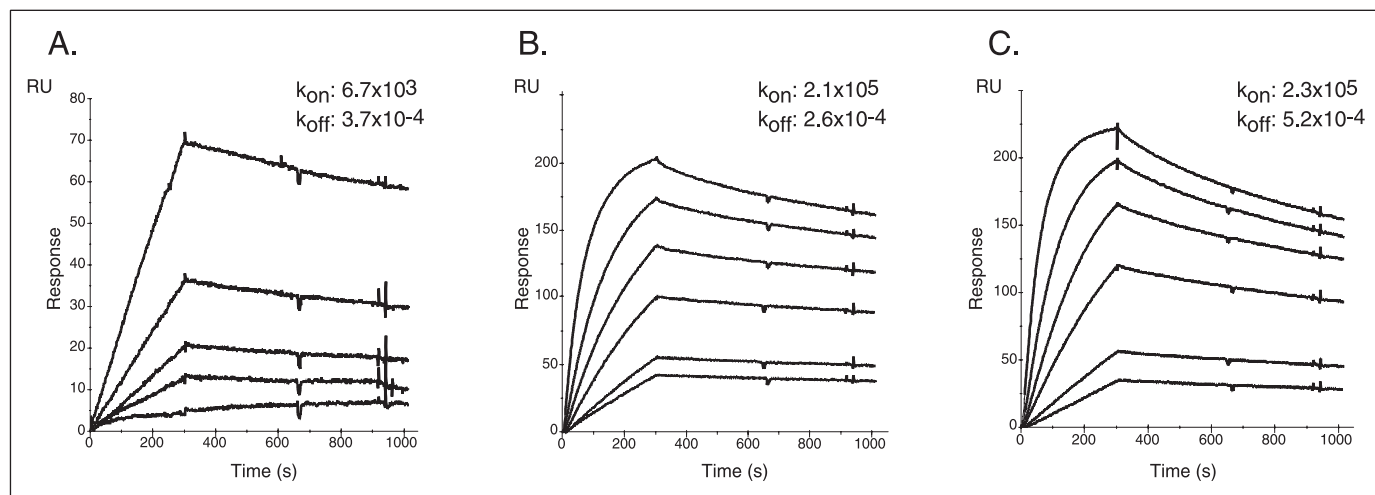
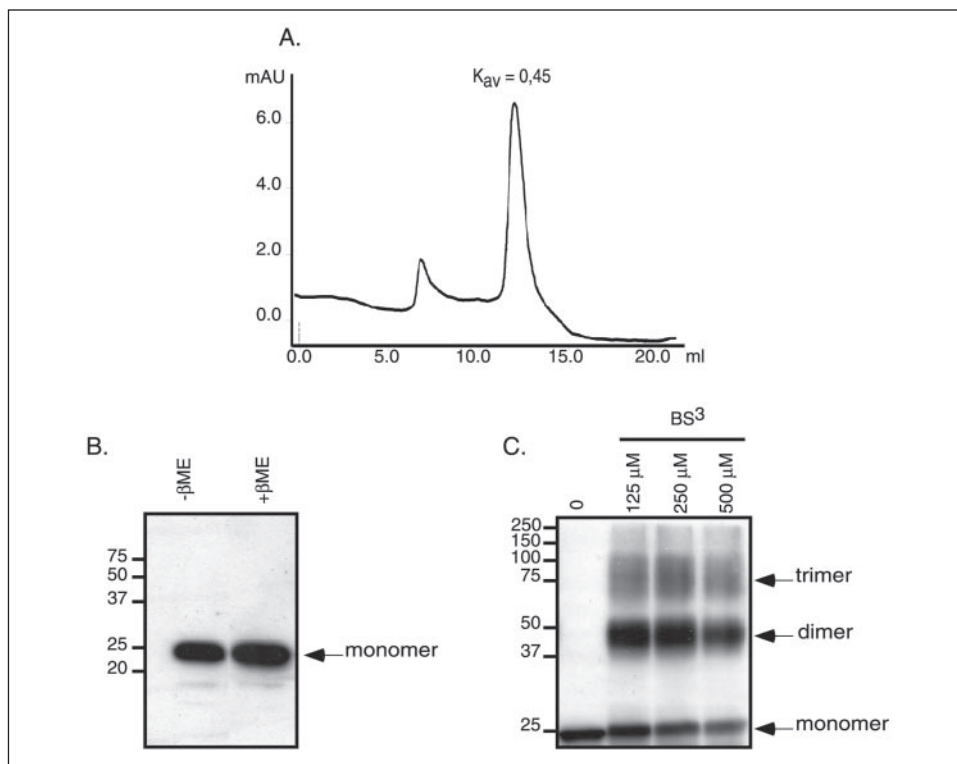


FIGURE 5. Dynamic analysis of AviTag-4-1BBLs (WT and C51S) and FLAG-4-1BBL binding to 4-1BB by BIAcore. Human 4-1BB/Fc was covalently coupled to the BIAcore chip and a range of concentrations (from 0.725 to 72.46 nM) of the different ligands were assayed for binding at 25 °C. Shown are sensograms of FLAG-4-1BBL (A), WT AviTag-4-1BBL (B), and C51S AviTag-4-1BBL (C). Calculated kinetic constants are indicated in each plot and correspond to the average value from two independent experiments.

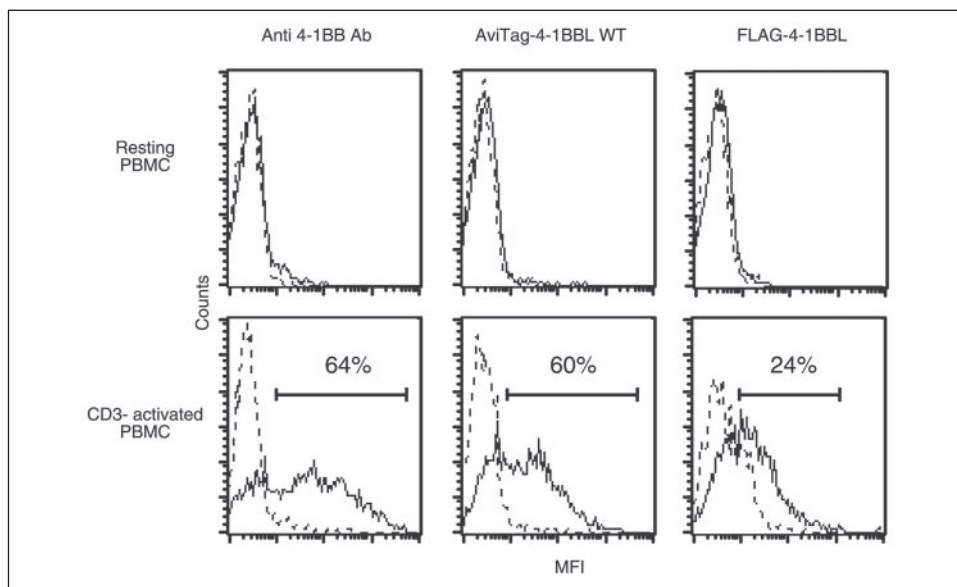
constants (k_{off}) were comparable ($2.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ for WT AviTag-4-1BBL versus $3.7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ for FLAG-4-1BBL). Given that unlike the dissociation constant, the association rate depends on the concentration of ligand, the most likely interpretation of the data is that only a small fraction of FLAG-4-1BBL had the proper trimeric conformation.

A comparison between WT and C51S AviTag-4-1BBL revealed that both proteins had very similar association rates (2.1×10^5 versus $2.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively), which is consistent with our hypothesis that the disulfide bond bears no influence on the trimeric conformation. In contrast, the proteins differed in terms of dissociation, with C51S AviTag-4-1BBL dissociating twice as fast as WT AviTag-4-1BBL ($5.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ versus $2.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, respectively) (Fig. 5). This suggests that the presence of the disulfide bond stabilizes the trimeric form of WT AviTag-4-1BBL.

Trimeric 4-1BBL Co-stimulates T Lymphocytes Only When Cross-linked—To investigate the functional properties of AviTag and FLAG-4-1BBL, we firstly checked their ability to recognize 4-1BB on CD3-stimulated T lymphocytes. Flow cytometry analyses revealed that biotinylated AviTag-4-1BBL stained a similar percentage of 4-1BB positive activated T cells (60%) as the anti-4-1BB mAb used as a positive control (64%), despite having a lower mean fluorescence intensity (Fig. 6). In contrast, staining with FLAG-4-1BBL was too low to conclusively identify all positive cells.

We then tested the ability of the two proteins in soluble form to co-stimulate the proliferation of either PBMC or purified T cells activated through immobilized anti-CD3 mAb. The major difference between these two experimental designs is that immobilized anti-CD3 mAb alone is sufficient to elicit a strong proliferation of PBMC because

FIGURE 6. Staining of 4-1BB on resting (top panels) or stimulated PBMC (bottom panels) using a control monoclonal anti-4-1BB Ab (left panels), AviTag-4-1BBL (10 μ g/ml), revealed by PE-conjugated streptavidin (center panels) or FLAG-4-1BBL (10 μ g/ml) revealed by biotinylated anti-FLAG mAb and PE-conjugated streptavidin (right panels). Dotted lines represent control staining with mouse IgG and secondary reagents. Percentages of positive cells are indicated.



of the presence of other cell types, such as macrophages and B cells, that can provide co-stimulation signals to T cells, whereas it is much less efficient at stimulating purified T lymphocytes proliferation. Soluble AviTag-4-1BBL dose dependently inhibited the proliferation of CD3-stimulated PBMC with a maximal inhibition of $\sim 57\%$ at 10 μ g/ml (Fig. 7A) but had no effect on CD3-stimulated T lymphocytes (Fig. 7B). Considered together, these data strongly suggested that the binding of soluble AviTag-4-1BBL to 4-1BB on T lymphocytes did not activate the co-stimulatory pathways but instead efficiently prevented 4-1BB/4-1BBL interactions between T lymphocytes and APCs. Likewise, soluble C51S AviTag-4-1BBL inhibited CD3-induced PBMC proliferation, although less efficiently than WT AviTag-4-1BBL ($33.0 \pm 9.6\%$ inhibition for C51S *versus* $57 \pm 5.8\%$ inhibition for WT at 10 μ g/ml, $p < 0.05$) (Fig. 7A). This finding further documented that the presence of the disulfide bond increased the stability of the trimeric form in solution. Finally, FLAG-4-1BBL was the least efficient to inhibit proliferation in accordance with its poor binding affinity for 4-1BB (Fig. 7A).

Because AviTag-4-1BBL showed no co-stimulatory activity when used in soluble form, it was decided to test its effect on T cell proliferation following immobilization on a matrix. For this purpose, streptavidin beads were coated with biotinylated AviTag-4-1BBL (either WT or C51S) or anti-FLAG mAb-coupled beads with FLAG-4-1BBL, and saturation of the beads was controlled by immunofluorescence with an anti-4-1BBL mAb. Interestingly, similar intensities of staining could be observed with beads coated with WT or C51S AviTag-4-1BBL, but no staining was observed with beads coated with FLAG-4-1BBL (Fig. 8A). The use of a polyclonal anti-4-1BBL antibody allowed us to ascertain whether FLAG-4-1BBL was indeed coated onto the beads. A test was then performed on these beads coated with different forms of 4-1BBL to assess their ability to co-stimulate proliferation of purified T cells. As shown in Fig. 8B, the addition of beads coated with WT or C51S AviTag-4-1BBL resulted in a very significant increase in proliferation of CD3-stimulated T cells (4793 ± 426 cpm for CD3 alone *versus* 14335 ± 1239 cpm for CD3 + WT AviTag-4-1BBL, $n = 10$, $p < 0.001$), whereas no stimulatory effect was observed with FLAG-4-1BBL-coated beads. Similar results were obtained with beads coated with WT AviTag-4-1BBL produced in S2 insect cells (data not shown). This demonstrated that, once AviTag-4-1BBL was cross-linked on beads, it could stimulate T cell proliferation, which was not the case with FLAG-4-1BBL that remained non-stimulatory after cross-linking. In addition, it should be

noted that no significant difference in stimulatory activities were seen between beads coated with WT or C51S AviTag-4-1BBL. This suggests either that cross-linking stabilized trimeric C51S AviTag-4-1BBL or that the differences in activity were overwhelmed by the amount of stimulatory signals.

We finally performed cross-linking of WT AviTag-4-1BBL with a molar excess of streptavidin to obtain all multimeric forms, from tetramers to monomers (Fig. 9A). Despite no clear cut separation of the peaks by gel filtration, narrow fractions corresponding to each peak were tested on CD3-stimulated T lymphocytes. It was observed that high complexes (tetramers and trimers) co-stimulated proliferation very efficiently and that dimers were slightly less active, whereas monomers were inactive (Fig. 9B). This confirmed the critical requirement of cross-linking to obtain a co-stimulatory effect of AviTag-4-1BBL on T cell proliferation.

DISCUSSION

We report the production, and biochemical and functional properties of a soluble form of the human 4-1BBL extracellular domain coupled to a biotinylation peptide, the AviTag. This protein was designed to include not only the THD of 4-1BBL but also the 43-amino-acid long tail. A model of the three-dimensional structure of the THD was generated that is compatible with a trimeric organization of 4-1BBL. We provide evidence by gel filtration analysis and cross-linking experiments that our chimeric protein AviTag-4-1BBL, whether produced in bacteria or in insect cells, could indeed refold as a trimer. In contrast, our data suggest that the commercial FLAG-4-1BBL, produced in HEK293 cells, was mainly present as a monomer in solution because no trimeric form and only a weak dimeric form could be detected after cross-linking with BS³. The hypothesis that FLAG-4-1BBL has a different conformation to AviTag-4-1BBL is further supported by several findings. First, our binding experiments showed that FLAG-4-1BBL displayed a much lower affinity for 4-1BB than AviTag-4-1BBL. Second, our staining experiments demonstrated that a monoclonal antibody against cell surface-expressed 4-1BBL could recognize AviTag-4-1BBL-coated beads but not FLAG-4-1BBL-coated beads (although we cannot rule out the possibility that this antibody recognized an epitope in the tail of 4-1BBL, a tail that is absent in FLAG-4-1BBL). Finally, we observed that monomeric FLAG-4-1BBL was soluble in aqueous solution, whereas monomeric AviTag-4-1BBL was not. An unsuccessful attempt was made to

FIGURE 7. Effect of soluble WT AviTag-4-1BBL, C51S AviTag-4-1BBL, and FLAG-4-1BBL on CD3 stimulation. A, PBMC proliferation (10^5 /well) induced by immobilized anti-CD3 mAb was dose dependently inhibited by soluble WT AviTag-4-1BBL (white circles), C51S AviTag-4-1BBL (black circles), and FLAG-4-1BBL (white diamonds). Each point represents the mean inhibition \pm S.E. of five distinct experiments. The mean incorporation of PBMC with anti-CD3 alone was 109839 cpm. **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$ when compared with CD3 alone. B, addition of soluble WT AviTag-4-1BBL or soluble FLAG-4-1BBL had no effect on the proliferation of purified T lymphocytes (10^5 /well) stimulated with anti-CD3 coated beads. Shown is mean \pm S.E. of three independent experiments.

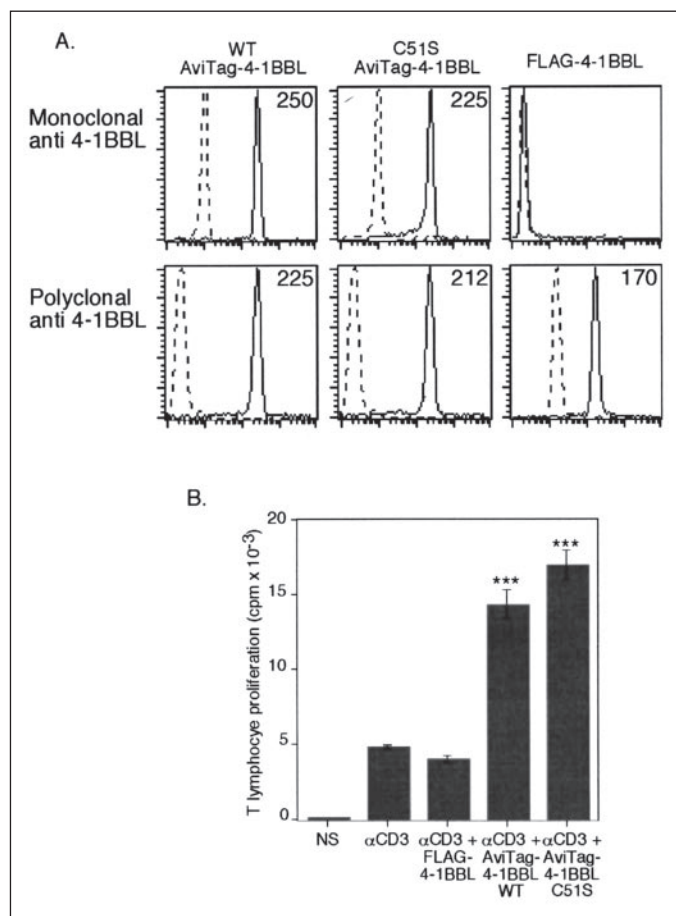
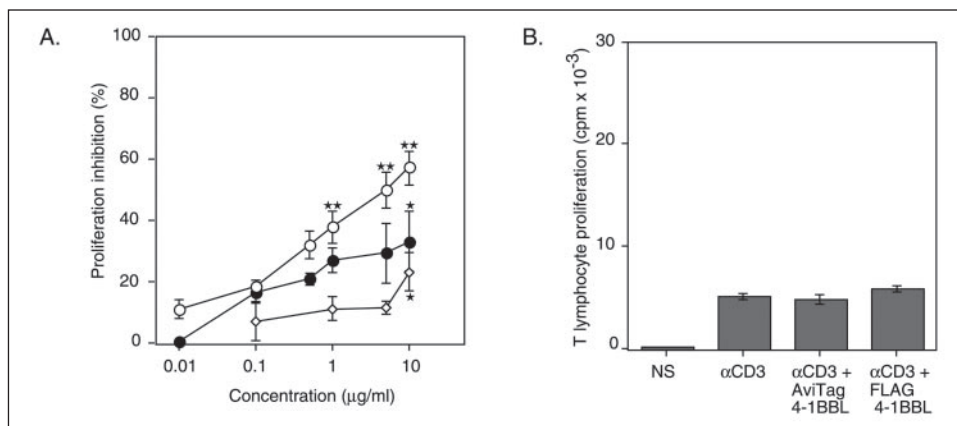


FIGURE 8. A, staining of streptavidin beads coated with WT (left panels), C51S (center panels), or anti-FLAG beads with FLAG-4-1BBL (right panels) with a monoclonal mouse anti-4-1BBL Ab (top panels) or a polyclonal goat anti-4-1BBL Ab (bottom panels). Dotted lines represent control staining of uncoated beads. Mean fluorescence of stained beads is indicated in each panel. Monoclonal anti-4-1BBL did not recognize FLAG-4-1BBL. The high background staining of anti-FLAG beads alone was because of partial binding of the secondary anti-goat antibody to mouse anti-FLAG mAb. **B**, effect of immobilized AviTag-4-1BBLs and FLAG-4-1BBL on T cell proliferation. Beads (1.3×10^5 /well) coated with WT ($n = 10$ independent experiments) or C51S ($n = 3$) AviTag-4-1BBL enhanced T cell proliferation but not FLAG-4-1BBL-coated beads ($n = 3$). Results are expressed as mean \pm S.E. ***, $p < 0.001$ compared with CD3 alone.

purify soluble monomeric AviTag-4-1BBL, in particular by denaturing trimers with heat or mild detergents, but no monomers were ever recovered due to aggregation (not shown). We surmise that the FLAG peptide, which is very hydrophilic, may actually hinder the trimerization of FLAG-4-1BBL while contributing to the solubility of the monomeric

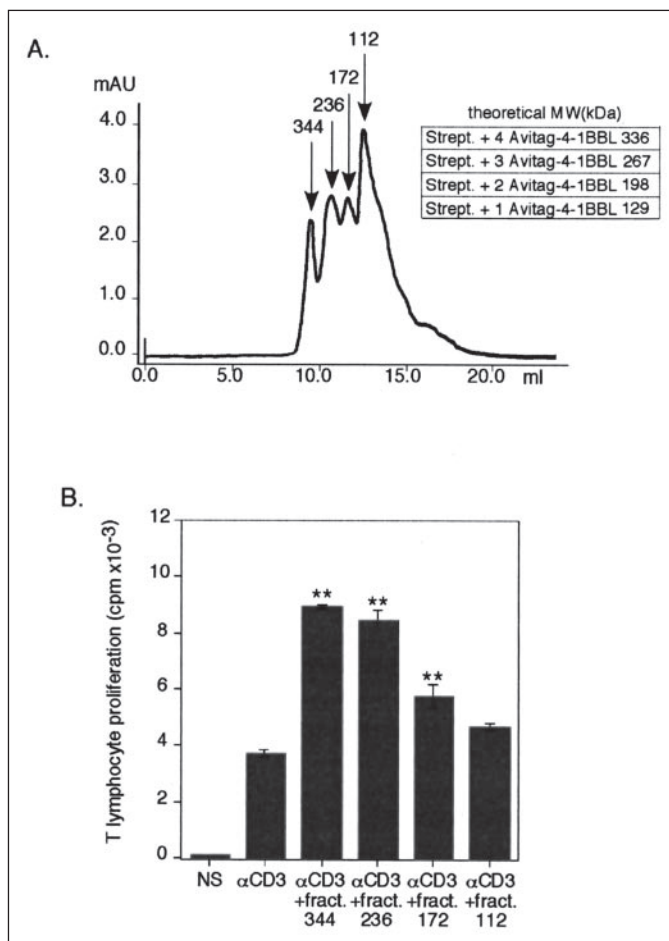


FIGURE 9. A, S00 gel filtration analysis of oligomers of WT AviTag-4-1BBL. Trimeric AviTag-4-1BBL was mixed with a molar excess of streptavidin to obtain all degrees of multimerization. Estimated molecular weight based on elution volume are indicated over each peak. The theoretical molecular weight of the different oligomers are mentioned in the inset. **B**, multimeric complexes (tetrameric, trimeric, and dimeric) efficiently co-stimulated purified T lymphocyte proliferation. A narrow fraction of each peak represented in A was added to purified T lymphocytes activated for 6 h with biotinylated anti-CD3 mAb coated beads. Results are expressed as mean \pm S.E. of three experiments. **, $p < 0.01$ compared with CD3 alone.

FLAG-4-1BBL. In support of such a supposition, a recent publication reported that short tags can have a major impact on protein conformation and crystallization (29). In our construct, the AviTag was placed at the end of the 43-amino-acid long tail, a position that apparently prevented the tag from interfering with the trimerization process.

In addition, we report that cysteine 51 located in the extracellular tail

region could form an interchain disulfide bond, and we provide evidence that this disulfide bond was naturally present in 4-1BBL expressed on T2 cells. Using BIAcore analysis it is demonstrated that the abrogation of the disulfide bond by mutation of the cysteine resulted in a 2-fold higher dissociation rate of the AviTag-4-1BBL-4-1BB complex. The absence of the disulfide bond also resulted in a diminished ability of the mutant AviTag-4-1BBL to inhibit 4-1BBL-4-1BB interactions during CD3-induced proliferation of PBMC. This suggests that the disulfide bond is important for the stabilization of the trimeric form of AviTag-4-1BBL and that it may also play a role in stabilizing physiologically expressed 4-1BBL. Moreover, the presence of a single disulfide bond within trimeric 4-1BBL leaves one cysteine free to establish an additional disulfide bond with an adjacent 4-1BBL trimer, leading to a higher degree of oligomerization of 4-1BBL at the cell surface. We did detect higher molecular weight forms after refolding of 4-1BBL (Fig. 2) and BS³ cross-linking (Fig. 3E) that may represent dimers of trimers, but their presence at the cell surface needs to be confirmed. In our experience these higher molecular weight forms were non-stimulatory (not shown) but this may have been because of an incorrect conformation of these forms in solution. In line with these observations, it would be useful to investigate whether an interchain disulfide bond is present in other TNF ligand family members such as CD40L, Apo-2L, or RANKL that also have cysteine residues in their tail region.

Most of the TNF ligand family members are synthesized as membrane-bound proteins, but soluble forms can be generated by limited proteolysis. Although some of the proteases involved in this process have been identified, such as ADAM proteases for TNF and RANKL (30, 31), matrilysin for FasL (32) or furins for BAFF, APRIL, TWEAK, and EDA (33, 34), others still remain unknown. Whether the soluble forms thus generated are biologically active depends on which ligand is considered and is still a matter of debate in some instances. For example, TNF α and lymphotoxin- α are undeniably active in soluble forms (35, 36), whereas despite earlier reports (37, 38) it is now agreed that FasL loses most of its apoptotic-inducing capacity when released in soluble form (39, 40). Similarly, soluble CD40L was initially reported to be as active as the membrane-bound form in stimulating B cell proliferation (41), but a recent study provided conclusive evidence that limited oligomerization is necessary for both FasL and CD40L activity (42). Accordingly, the B cell-stimulating activity of the commercial FLAG-CD40L (Alexis) is described by the manufacturer as greatly enhanced by cross-linking with an anti-FLAG mAb. Our own experience with FLAG-CD40L, used to induce dendritic cell maturation, confirmed that cross-linking with anti-FLAG mAb was necessary for optimal activity (43). The data that we present in this report about 4-1BBL are in agreement with those concerning CD40L and FasL. In fact, we demonstrated that soluble trimeric AviTag-4-1BBL could bind recombinant 4-1BB with a high affinity (1.2 nM for WT and 2.3 nM for C51S AviTag-4-1BBL) but that this binding has no co-stimulating effect on CD3-stimulated T lymphocytes. Nonetheless, this binding efficiently prevented 4-1BBL-4-1BB interactions among CD3-stimulated PBMC and thus significantly inhibited proliferation. These observations are at odds with a previous publication reporting that soluble 4-1BBL released by certain B cell lines such as the Raji cell line could co-stimulate CD3-activated T lymphocytes (44). However, in this latter report, the authors used concentrated crude supernatants from Raji cells as a source of soluble 4-1BBL, and it is therefore difficult to rule out the presence of aggregates and/or membrane fragments or vesicles that may have achieved sufficient 4-1BBL cross-linking to activate T cells. In fact, we demonstrated that AviTag-4-1BBL trimers became highly efficient in co-stimulating T lymphocyte

proliferation once they were cross-linked either on beads or by streptavidin. The requirement for cross-linking to obtain T cell co-stimulating activity of recombinant soluble 4-1BBL has already been suggested in the mouse (9). Our data also showed that two cross-linked AviTag-4-1BBL trimers were sufficient to trigger co-stimulatory signals, although a higher degree of oligomerization led to enhanced co-stimulation (Fig. 9). These data tally with those previously reported with FasL and CD40L showing that two trimeric FasL or two trimeric CD40L were sufficient to trigger apoptosis or B cell proliferation, respectively, whereas a higher degree of multimerization further enhanced CD40L stimulation (but not FasL) (42).

In conclusion, we have produced a soluble human 4-1BBL that should be a versatile and useful tool to study 4-1BBL-4-1BB interactions in T cell activation, because it contains the proper trimeric conformation, has a high affinity for 4-1BB, and can be used either to mimic or block these interactions.

REFERENCES

- Goodwin, R. G., Din, W. S., Davis-Smith, T., Anderson, D. M., Gimpel, S. D., Sato, T. A., Maliszewski, C. R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Farrah, T., Armitage, R. J., Fanslow, W. C., and Smith, C. A. (1993) *Eur. J. Immunol.* **23**, 2631–2641
- Alderson, M. R., Smith, C. A., Tough, T. W., Davis-Smith, T., Armitage, R. J., Falk, B., Roux, E., Baker, E., Sutherland, G. R., and Din, W. S. (1994) *Eur. J. Immunol.* **24**, 2219–2227
- Vinay, D. S., and Kwon, B. S. (1998) *Semin. Immunol.* **10**, 481–489
- Kwon, B. S., and Weissman, S. M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 1963–1967
- Lee, H. W., Park, S. J., Choi, B. K., Kim, H. H., Nam, K. O., and Kwon, B. S. (2002) *J. Immunol.* **169**, 4882–4888
- Starck, L., Scholz, C., Dorken, B., and Daniel, P. T. (2005) *Eur. J. Immunol.* **35**, 1257–1266
- Bertram, E. M., Dawicki, W., Sedgmen, B., Bramson, J. L., Lynch, D. H., and Watts, T. H. (2004) *J. Immunol.* **172**, 981–988
- Melero, I., Shuford, W. W., Newby, S. A., Aruffo, A., Ledbetter, J. A., Hellstrom, K. E., Mittler, R. S., and Chen, L. (1997) *Nat. Med.* **3**, 682–685
- Saoulli, K., Lee, S. Y., Cannons, J. L., Yeh, W. C., Santana, A., Goldstein, M. D., Bangia, N., DeBenedette, M. A., Mak, T. W., Choi, Y., and Watts, T. H. (1998) *J. Exp. Med.* **187**, 1849–1862
- Cannons, J. L., Lau, P., Ghumman, B., DeBenedette, M. A., Yagita, H., Okumura, K., and Watts, T. H. (2001) *J. Immunol.* **167**, 1313–1324
- Hurtado, J. C., Kim, Y. J., and Kwon, B. S. (1997) *J. Immunol.* **158**, 2600–2609
- Shuford, W. W., Klussman, K., Tritchler, D. D., Loo, D. T., Chalupny, J., Siadak, A. W., Brown, T. J., Emswiler, J., Raecho, H., Larsen, C. P., Pearson, T. C., Ledbetter, J. A., Aruffo, A., and Mittler, R. S. (1997) *J. Exp. Med.* **186**, 47–55
- Gramaglia, I., Cooper, D., Miner, K. T., Kwon, B. S., and Croft, M. (2000) *Eur. J. Immunol.* **30**, 392–402
- Wen, T., Bukczynski, J., and Watts, T. H. (2002) *J. Immunol.* **168**, 4897–4906
- Maus, M. V., Thomas, A. K., Leonard, D. G., Allman, D., Addya, K., Schlienger, K., Riley, J. L., and June, C. H. (2002) *Nat. Biotechnol.* **20**, 143–148
- Shindyalov, I. N., and Bourne, P. E. (1998) *Protein Eng.* **11**, 739–747
- Holm, L., and Sander, C. (1993) *J. Mol. Biol.* **233**, 123–138
- Sali, A., and Blundell, T. L. (1993) *J. Mol. Biol.* **234**, 779–815
- Eisenberg, D., Luthy, R., and Bowie, J. U. (1997) *Methods Enzymol.* **277**, 396–404
- Sippl, M. J. (1993) *Proteins* **17**, 355–362
- Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R., and Thornton, J. M. (1996) *J. Biomol. NMR* **8**, 477–486
- Brooks, B. R., Brucoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., and Karplus, M. (1983) *J. Comp. Chem.* **4**, 187–217
- Honig, B., and Nicholls, A. (1995) *Science* **268**, 1144–1149
- Gilson, M. K., and Honig, B. (1988) *Proteins* **4**, 7–18
- Engelman, D. M., and Steitz, T. A. (1981) *Cell* **23**, 411–422
- Bordier, C. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 1604–1607
- Bodmer, J. L., Schneider, P., and Tschopp, J. (2002) *Trends Biochem. Sci.* **27**, 19–26
- Banner, D. W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H. J., Broger, C., Loetscher, H., and Lesslauer, W. (1993) *Cell* **73**, 431–445
- Bucher, M. H., Evdokimov, A. G., and Waugh, D. S. (2002) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **58**, 392–397
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., and

- Cerretti, D. P. (1997) *Nature* **385**, 729–733
31. Lum, L., Wong, B. R., Josien, R., Becherer, J. D., Erdjument-Bromage, H., Schlondorff, J., Tempst, P., Choi, Y., and Blobel, C. P. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 13613–13618
 32. Powell, W. C., Fingleton, B., Wilson, C. L., Boothby, M., and Matrisian, L. M. (1999) *Curr. Biol.* **9**, 1441–1447
 33. Chen, Y., Molloy, S. S., Thomas, L., Gambee, J., Bachinger, H. P., Ferguson, B., Zonana, J., Thomas, G., and Morris, N. P. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 7218–7223
 34. Schneider, P., MacKay, F., Steiner, V., Hofmann, K., Bodmer, J. L., Holler, N., Ambrose, C., Lawton, P., Bixler, S., Acha-Orbea, H., Valmori, D., Romero, P., Werner-Favre, C., Zubler, R. H., Browning, J. L., and Tschopp, J. (1999) *J. Exp. Med.* **189**, 1747–1756
 35. Smith, R. A., and Baglioni, C. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 6951–6954
 36. Warzocha, K., Bienvenu, J., Coiffier, B., and Salles, G. (1995) *Eur. Cytokine Netw.* **6**, 83–96
 37. Tanaka, M., Suda, T., Takahashi, T., and Nagata, S. (1995) *EMBO J.* **14**, 1129–1135
 38. Martinez-Lorenzo, M. J., Alava, M. A., Anel, A., Pineiro, A., and Naval, J. (1996) *Immunology* **89**, 511–517
 39. Suda, T., Hashimoto, H., Tanaka, M., Ochi, T., and Nagata, S. (1997) *J. Exp. Med.* **186**, 2045–2050
 40. Schneider, P., Holler, N., Bodmer, J. L., Hahne, M., Frei, K., Fontana, A., and Tschopp, J. (1998) *J. Exp. Med.* **187**, 1205–1213
 41. Mazzei, G. J., Edgerton, M. D., Losberger, C., Lecoanet-Henchoz, S., Graber, P., Durandy, A., Gauchat, J. F., Bernard, A., Allet, B., and Bonnefoy, J. Y. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 7025–7028
 42. Holler, N., Tardivel, A., Kovacovics-Bankowski, M., Hertig, S., Gaide, O., Martinon, F., Tinel, A., Deperthes, D., Calderara, S., Schulthess, T., Engel, J., Schneider, P., and Tschopp, J. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1428–1440
 43. Carbone, D., Ebstein, F., Rabu, C., Petit, J. Y., Gregoire, M., and Lang, F. (2005) *Eur. J. Immunol.* **35**, 546–556
 44. Salih, H. R., Schmetzer, H. M., Burke, C., Starling, G. C., Dunn, R., Pelka-Fleischer, R., Nuessler, V., and Kiener, P. A. (2001) *J. Immunol.* **167**, 4059–4066

B. Données complémentaires

1. Détermination de la concentration saturante d'AviTag-4-1BBL

Pour immobiliser l'AviTag-4-1BBL, nous avons choisi d'exploiter la très forte affinité de l'interaction biotine-streptavidine. La protéine est biotinylée enzymatiquement sur la lysine portée par le peptide AviTag (une seule molécule de biotine par monomère) et peut donc se fixer de manière quasi covalente ($K_d=10^{15}$) à des billes streptavidinées (Dyna). Les billes sont magnétiques, ce qui permet de les isoler facilement sur un aimant.

Afin de déterminer avec précision la concentration saturante d'AviTag-4-1BBL à utiliser sur les billes, nous avons mis au point une technique de calibration. Une gamme d'AviTag-4-1BBL de concentration décroissante (sur 12 points) est incubée avec une quantité fixe de billes streptavidine M280 (67 000). Ces billes sont ensuite marquées par un anticorps monoclonal anti 4-1BBL couplé à la phycoérythrine (PE) et analysées au FACS. La concentration saturante est définie comme la plus grande dilution permettant de rester au plateau de fluorescence (fig. 8).

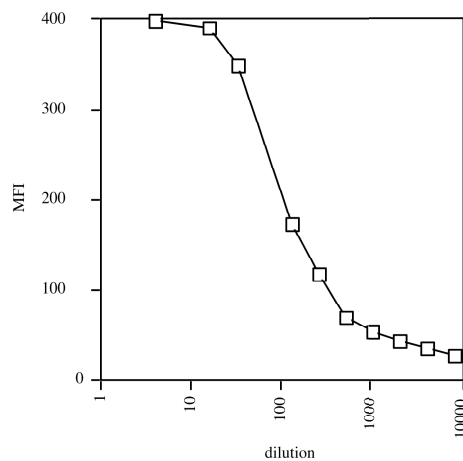


Figure 8. Courbe de saturation des billes streptavidine par l'AviTag-4-1BBL.

Cette évaluation de la quantité de protéine à utiliser sur les billes permet de s'affranchir des éventuelles formes non biotinylées (protéines tronquées produites par la bactérie qui ne porteraient plus le peptide AviTag) et permet également de manière rapide de calibrer les différents lots de production.

2. Spécificité de la co-stimulation par l'AviTag-4-1BBL sur des lymphocytes T purifiés.

Nous avons montré dans un modèle de stimulation de lymphocytes T purifiés par de l'anti-CD3, que l'AviTag-4-1BBL co-stimule la prolifération s'il est utilisé immobilisé. Nous montrons ici que cet effet est spécifique de l'interaction avec le 4-1BB, puisque l'ajout sous forme soluble d'un anticorps monoclonal anti-4-1BBL (clone C65-485) inhibe significativement ($p < 0,05$) et de manière dose dépendante la prolifération, alors que cet anticorps utilisé seul n'a pas d'effet (fig. 9).

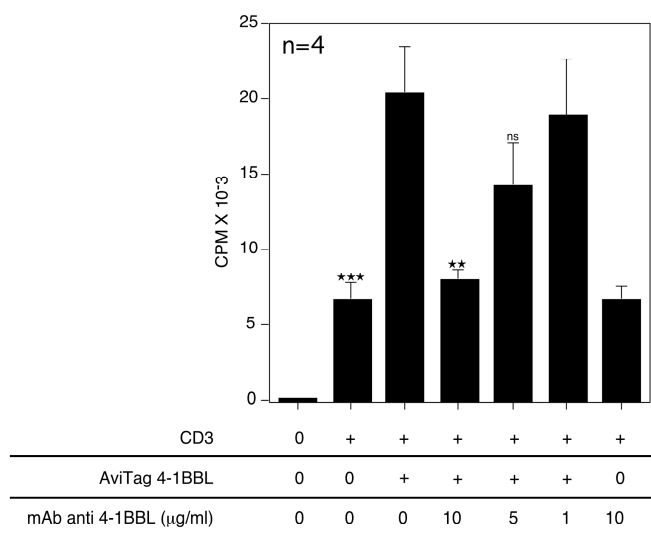


Figure 9. Spécificité de la prolifération T induite par l'AviTag-4-1BBL. 10^5 lymphocytes T purifiés sont stimulés pendant 72h par de l'anti-CD3 (clone UCHT1) immobilisé sur des billes streptavidine M280 (Dyna) en présence billes AviTag-4-1BBL et de doses décroissantes d'anticorps monoclonal anti-4-1BBL. Les résultats représentent les moyennes de l'incorporation de thymidine tritiée sur les 18 dernières heures de cultures \pm SEM. L'analyse statistique a été effectuée par une ANOVA suivie d'un test de Tukey-Kramer, les ★ indiquent une différence significative par rapport à la stimulation CD3+AviTag-4-1BBL (★★★: $p < 0,001$ et ★★: $p < 0,05$).

3. Quand ajouter le 4-1BBL ?

Le 4-1BB étant une molécule inductible, nous avons voulu déterminer s'il y avait un intérêt à ajouter le 4-1BBL en décalage par rapport à la stimulation par de l'anti-CD3, afin d'éviter tout risque de dégradation à 37°C, ou si au contraire il était important que le ligand soit présent dès l'apparition du récepteur. Sur trois donneurs différents, nous avons ajouté le 4-

1BBL soit conjointement à l'anti-CD3 (mais sur des billes indépendantes), soit 24h après. Nous montrons que la co-stimulation est identique dans les deux cas (co-stimulation d'un facteur trois environ) (fig. 10).

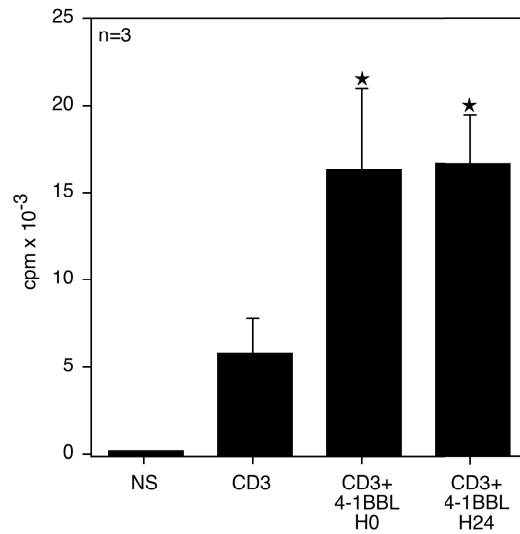


Figure 10. Quand ajouter le 4-1BBL par rapport à la stimulation CD3 pour garantir une activité optimale ? Les résultats représentent les moyennes de l'incorporation de thymidine tritiée sur les 18 dernières heures de cultures \pm SEM. L'analyse statistique a été effectuée par un test de Tukey-Kramer post ANOVA, les \star indiquent une différence significative par rapport à la stimulation CD3 (\star : $p < 0,01$).

4. Comparaison de la co-stimulation AviTag-4-1BBL à une co-stimulation par des anticorps monoclonaux anti-CD28 et anti-4-1BB.

Le CD28 est reconnu comme étant le principal signal de co-stimulation, et de nombreuses études portant sur le couple 4-1BB/4-1BBL ont comparé ces deux voies. Plusieurs études suggèrent que dans un modèle d'activation primaire, c'est le couple CD28/B7 qui intervient en premier, alors que le 4-1BB n'intervient que secondairement (Cannons *et al.*, 2001; Bertram *et al.*, 2004a). Nous avons comparé la co-stimulation fournie par l'AviTag-4-1BBL à celle fournie par un anticorps monoclonal anti-CD28 (clone CD28.2), en guise de référence. De plus, nous avons comparé la co-stimulation induite par un anti-4-1BB (Garni-Wagner *et al.*, 1996) (fig. 11) à celle fournie par le ligand recombinant dont nous disposons. Tous les signaux d'activation ont été fournis par des billes streptavidine recouvertes des différents ligands biotinylés (anti-CD3, anti-CD28 et AviTag-4-1BBL).

Nous confirmons qu'au cours d'une activation primaire *in vitro* de lymphocytes T purifiés, le signal CD28 est beaucoup plus efficace que le signal 4-1BB pour la prolifération. En revanche, l'anticorps anti-4-1BB est très peu efficace dans ce modèle, en tout cas moins que

le ligand recombinant. Cet anticorps a été décrit comme agoniste quand il est immobilisé au plastique (Kim *et al.*, 2002). Nous avons utilisé cet anticorps sous une forme biotinylée, et on ne peut pas exclure que la biotinylation chimique de l'anticorps (et donc de l'ensemble des amines primaires) ait pu altérer le paratope de l'anticorps, le rendant incapable de co-stimuler la prolifération.

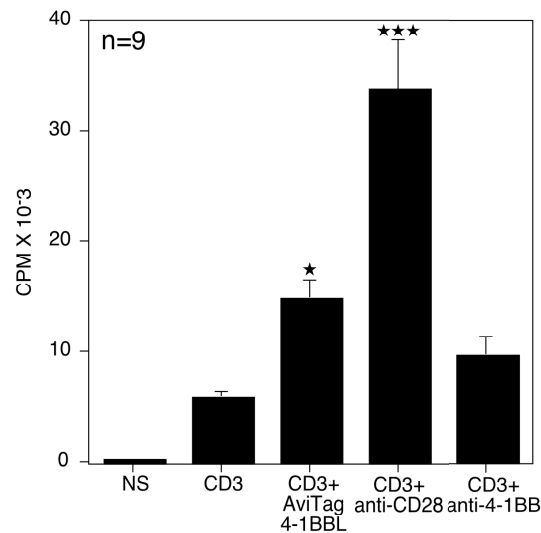


Figure 11. Comparaison de différents type de co-stimulation. 10^5 lymphocytes T purifiés sont stimulés pendant 72h par de l'anti-CD3 immobilisé sur des billes streptavidine M280 (Dyna) en présence de billes AviTag-4-1BBL ou de billes anti-CD28 ou de billes anti-4-1BB. Les résultats représentent les moyennes d'incorporation de thymidine tritiée sur les 18 dernières heures de cultures \pm SEM. L'analyse statistique a été effectuée par une ANOVA suivie d'un test de Tukey-Kramer, les \star indiquent une différence significative par rapport à la stimulation CD3 seule ($\star\star\star$: $p < 0,001$ et \star : $p < 0,01$).

5. Etude d'un troisième 4-1BBL recombinant (Chemicon)

Les mesures d'affinité du 4-1BBL pour le 4-1BB effectuées par BiaCore suggèrent que seules les formes correctement repliées (et donc trimériques) de 4-1BBL sont susceptibles de s'associer au 4-1BB. Dans une étude complémentaire, nous montrons que du 4-1BBL recombinant humain d'une troisième origine (Chemicon) a une affinité (Kd) intermédiaire entre celle de l'AviTag-4-1BBL et celle du FLAG-4-1BBL (AviTag-4-1BBL : 1,2 nM, 4-1BBL Chemicon : 7,35 nM et FLAG-4-1BBL : 55,2 nM). La constante d'association est proche de celle des AviTag ($8,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour le 4-BBL Chemicon vs. $2,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour l'AviTag-4-1BBL WT) et la constante de dissociation proche de celle de l'AviTag-4-1BBL C51S ($6,1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ pour le 4-BBL Chemicon vs. $5,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ pour l'AviTag-4-1BBL C51S) (tableau III).

	AviTag-4-1BBL WT	AviTag-4-1BBL C51S	FLAG-4-1BBL	4-1BBL Chemicon
k_{on}	$2,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$2,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$6,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$8,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k_{off}	$2,6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$5,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$3,7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$6,1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
Kd	1,2 nM	2,3 nM	55,2 nM	7,35 nM

Tableau III. Constantes d'affinité des différents 4-1BBL recombinants pour le 4-1BB.

Il est donc vraisemblable qu'une proportion beaucoup plus importante de 4-1BBL Chemicon soit sous forme trimérique par rapport au FLAG-4-1BBL. Or, dans sa séquence, le 4-1BBL Chemicon ne comporte ni tag ni queue précédant le domaine d'homologie au TNF (sa séquence contient les 185 premiers acides aminés du domaine extra-cellulaire). Ces résultats confortent donc, quoique indirectement, l'hypothèse selon laquelle le peptide FLAG générerait la trimérisation du 4-1BBL en masquant au moins partiellement les zones impliquées dans la structure tridimensionnelle correcte. Dans le cas de l'AviTag-4-1BBL, le tag est éloigné du domaine de trimérisation par la conservation de la queue, et ne gêne donc pas la trimérisation.

Une fois le trimère formé, les études de BiaCore comparant l'AviTag WT et C51S ont montré l'importance du pont disulfure formé entre deux monomères dans la stabilisation du complexe. Ce résultat est confirmé par l'étude du 4-1BBL Chemicon qui présente une constante de dissociation très similaire à celle de l'AviTag-4-1BBL C51S ($6,1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ et $5,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ pour l'AviTag C51S pour le 4-1BBL Chemicon) et double par rapport à l'AviTag-4-1BBL WT ($2,6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$).

La construction AviTag-4-1BBL WT semble donc une stratégie optimale, permettant de disposer d'une protéine trimérique, co-stimulante quand elle est immobilisée par l'intermédiaire du tag et capable d'inhiber la prolifération T si elle est utilisée en soluble.

C. Commentaires

Cette étude sur la caractérisation biochimique et fonctionnelle du 4-1BBL humain permet de mieux situer cette protéine parmi les autres membres de la superfamille du TNF. Nous avons tout d'abord mis en évidence le caractère trimérique de la protéine, ce qui est un élément constant pour tous les membres de la famille caractérisés jusqu'à présent. En revanche, la présence d'un pont disulfure entre deux des monomères constituant le trimère est un élément de structure original, qui jusqu'à présent n'a été décrit que dans la structure de TRAIL, un autre membre de la famille (Trabzuni *et al.*, 2000). Dans le cas de TRAIL, la cystéine 230

impliquée dans le pont disulfure est située dans le domaine d'homologie au TNF et cette cystéine participe à la formation du trimère. Dans le cas du 4-1BBL, la cystéine est en position 51, dans la queue extra-cellulaire, et le pont disulfure intervient dans la stabilisation du complexe trimérique en solution. Nous avons montré que ce pont disulfure est présent physiologiquement à la surface des cellules. Il serait intéressant de voir si d'autres membres de la famille, possédant également des cystéines dans le domaine extracellulaire en amont du THD ont la capacité de s'associer en homotrimère selon un schéma identique.

Au cours du processus de renaturation, nous avons obtenu deux formes de 4-1BBL : une correspond à du trimère (fig. 12A), l'autre a un poids moléculaire compatible avec du dimère de trimère. Cette dernière ne permettant pas de co-stimuler la prolifération T, nous l'avons considérée comme mal renaturée, mais elle évoque le fait que des plus gros complexes moléculaires de 4-1BBL peuvent exister. En solution, pour des raisons d'encombrement stérique, un complexe hexamérique de dimère de trimère pourrait se former très majoritairement « tête-bêche » (fig. 12B), tandis qu'à la surface d'une cellule, le complexe serait maintenu dans une orientation physiologique par son domaine transmembranaire enchâssé dans la membrane lipidique (fig. 12C). Il serait envisageable de démontrer l'existence de ces dimères de trimères à la surface des cellules en utilisant des agents de couplage type BS³.

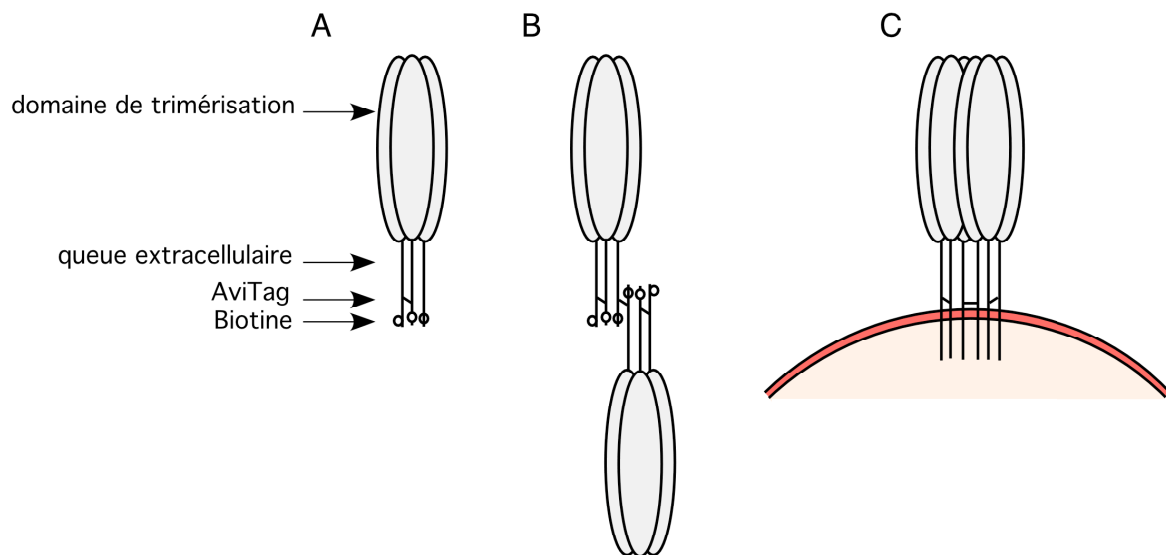


Figure 12. Représentation schématique des différents complexes d'AviTag-4-1BBL. La forme A représente le trimère. La forme B correspond au dimère de trimère « tête-bêche » en solution, et la forme C au dimère de trimère orienté dans une membrane lipidique.

Au sein de la superfamille du TNF, il existe une dichotomie entre les membres qui sont actifs sous forme soluble, comme le TNF lui-même, et ceux qui sont inhibiteurs en soluble et qui nécessitent une immobilisation préalable pour être actifs (FasL, CD40L). Entre nos mains, le 4-1BBL trimérique est inactif sans immobilisation préalable pour co-stimuler des lymphocytes T purifiés. En séparant les différentes formes d'AviTag-4-1BBL multimérisées en présence d'un excès de streptavidine non couplée (dimère, trimère et tétramère de trimère), nous avons montré que le degré de multimérisation minimum nécessaire à une activité de co-stimulation est de deux trimères. Des résultats similaires ont été documentés pour FasL : en construisant des dimères de trimères de FasL, une équipe a montré que ces formes étaient capables d'induire l'apoptose alors que les trimères de FasL sont inactifs en solution (Holler *et al.*, 2003). Pour Salih *et al.*, le 4-1BBL membranaire exprimé par la lignée Raji peut être clivé par une métalloprotéase et la forme soluble, issue de surnageant concentré, est co-stimulante (Salih *et al.*, 2001). Ils ne peuvent cependant pas exclure formellement la présence d'agrégats protéiques dans les échantillons testés en solubles, qui peuvent fournir un degré d'immobilisation suffisant pour induire une activité.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de données sur la localisation du site de clivage enzymatique sur le 4-1BBL par les métalloprotéases. Il est néanmoins probable que la forme soluble générée ne comporte plus de pont disulfure (la cystéine extra-cellulaire est le deuxième acide aminé après la membrane). Nos données sur la faible stabilité du trimère en l'absence de pont disulfure laisse supposer qu'*in vivo* une forme soluble de 4-1BBL serait probablement peu efficace comme inhibiteur de l'interaction 4-1BB/4-1BBL.

III. MISE AU POINT DES CONDITIONS D'AMPLIFICATION LYMPHOCYTAIRES T SPECIFIQUES A L'AIDE DE HLA-A2/PEPTIDE ET DE 4-1BBL DANS LE CONTEXTE VIRAL.

Un des principaux objectifs de mon travail de thèse justifiant la production et la caractérisation de 4-1BBL telles que je les ai décrites précédemment était la mise au point d'une méthode permettant d'amplifier spécifiquement des lymphocytes T en système acellulaire.

En effet, de nombreux protocoles d'immunothérapie passive reposent sur l'injection de lymphocytes T CD8⁺ humains. Celui qui intéresse particulièrement notre laboratoire concerne l'injection de lymphocytes T dirigés contre des antigènes exprimés par les cellules cancéreuses et susceptibles d'aller les détruire. D'autres protocoles visent à rétablir une immunité anti-CMV ou anti-EBV efficace suite à des greffes de moelle osseuse, afin de prévenir d'éventuels développements de cancers viro-induits chez des patients immunodéprimés. L'amplification de cellules à usage thérapeutique présente donc un intérêt dans des contextes antigéniques différents.

Des méthodes d'obtention des lymphocytes T CD8⁺ utilisant des lignées présentatrices d'antigène et nourricières sécurisées sont actuellement utilisées dans des protocoles cliniques (Gervois *et al.*, 2000; Vignard *et al.*, 2005). Plusieurs équipes élaborent cependant de nouveaux procédés d'amplification utilisant des cellules présentatrices d'antigènes artificielles permettant de contrôler précisément les signaux d'activation fournis et plus facilement sécurisable d'un point de vue sanitaire (Maus *et al.*, 2002; Oelke *et al.*, 2003).

Nous avons choisi de développer une méthode basée sur l'utilisation de billes streptavidine qui servent de support d'immobilisation pour les ligands activateurs biotinylés que sont le HLA-A2/peptide en signal 1, et l'AviTag4-1BBL ou l'anti-CD28 en signal de co-stimulation. Nous avons mis au point notre méthode d'amplification dans deux contextes antigéniques viraux différents: un épitope (NLVPMVATV₄₉₅₋₅₀₃) de la protéine pp65 (antigène du virus CMV) et un épitope (GLCTLVAML₂₅₉₋₂₆₇) de la protéine BMLF-1 (antigène lytique du virus de l'EBV). La réponse immunitaire à ces deux infections virales latentes est bien étudiée et laisse penser que les lymphocytes T générés contre ces deux épitopes ne sont pas identiques phénotypiquement, et vraisemblablement pas au même stade de différenciation. Il est donc intéressant d'étudier le rôle de la co-stimulation par le 4-1BBL dans ces deux modèles. De plus, une importante proportion des individus est porteuse de ces deux virus de manière

généralement asymptomatique (50% pour le CMV et 90% pour l'EBV). Nous pouvions donc étudier facilement un nombre important d'individus EBV+CMV+ et disposer pour chacun de grande quantité de cellules.

A. Principe de l'amplification

Le principe de l'amplification de lymphocytes T spécifiques repose sur la co-culture pendant quatorze jours des cellules avec des billes recouvertes des ligands activateurs en présence de cytokines (fig. 13).

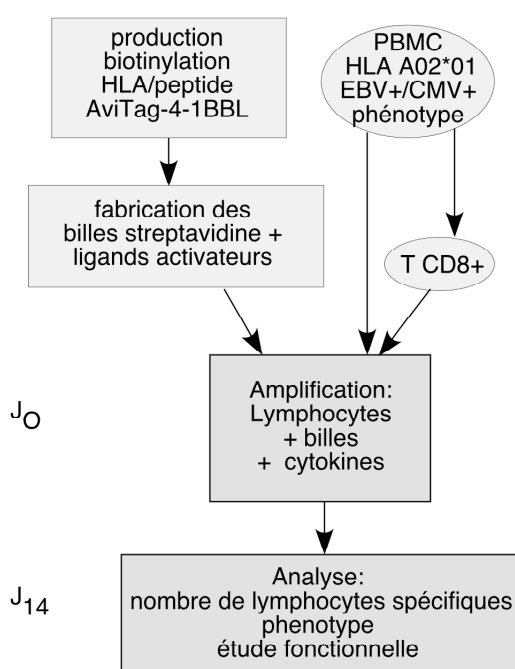


Figure 13. Principe général de l'amplification des lymphocytes T spécifiques.

B. Les lymphocytes

1. Obtention des cellules

Pour cette étude, nous avons tout d'abord récolté, par l'intermédiaire de l'Etablissement Français du Sang de Nantes, des échantillons de sang périphérique de dix donneurs HLA-A*0201. Le laboratoire de virologie du CHU de Nantes a réalisé une recherche d'IgG spécifiques sur les échantillons de sérum, permettant de déterminer que les dix donneurs

étaient EBV positifs hors période de réactivation, et sept d'entre eux CMV positifs (tableau IV).

2. Caractérisation des lymphocytes T spécifiques à J0.

A J0, sur l'ensemble des donneurs, nous avons évalué par double marquage tétramère HLA-A*0201/peptide (pp65 ou BMLF-1) et anti-CD8 la fréquence des cellules dirigées contre ces deux épitopes. Les résultats sérologiques de chaque individu pour les deux virus ainsi que les fréquences de lymphocytes détectés par les tétramères HLA-peptide étudiés correspondants sont regroupés dans le tableau IV. Dans un souci d'homogénéité, les pourcentages indiquent les cellules tétramères positives parmi les T CD8+.

donneur	pp65		BMLF-1	
	sérologie	fréquence	sérologie	fréquence
330	+	non détectable	+	0,18 %
339	+	1,3 %	+	0,34 %
2603	-	non détectable	+	0,07 %
1304	-	non détectable	+	0,69 %
1604	+	0,33 %	+	1,15 %
0505	+	0,24 %	+	0,06 %
1005	+	0,42 %	+	0,36 %
1105	+	3,3 %	+	0,06 %
0607	+	0,23 %	+	0,07 %
0408	-	non détectable	+	0,30 %

Tableau IV. Fréquence en pourcentage parmi les T CD8+ des lymphocytes dirigés contre les épitopes pp65 et BMLF-1.

Nous nous sommes également intéressés au statut CD28 de ces cellules afin de mieux caractériser les populations que nous allons cibler dans les expériences d'amplification. En accord avec les résultats de Appay *et al.* (Appay *et al.*, 2002a), nous montrons que les lymphocytes dirigés contre l'épitope BMLF-1 sont plutôt CD28+, alors que celle commises contre pp65 sont majoritairement CD28- (fig. 14).

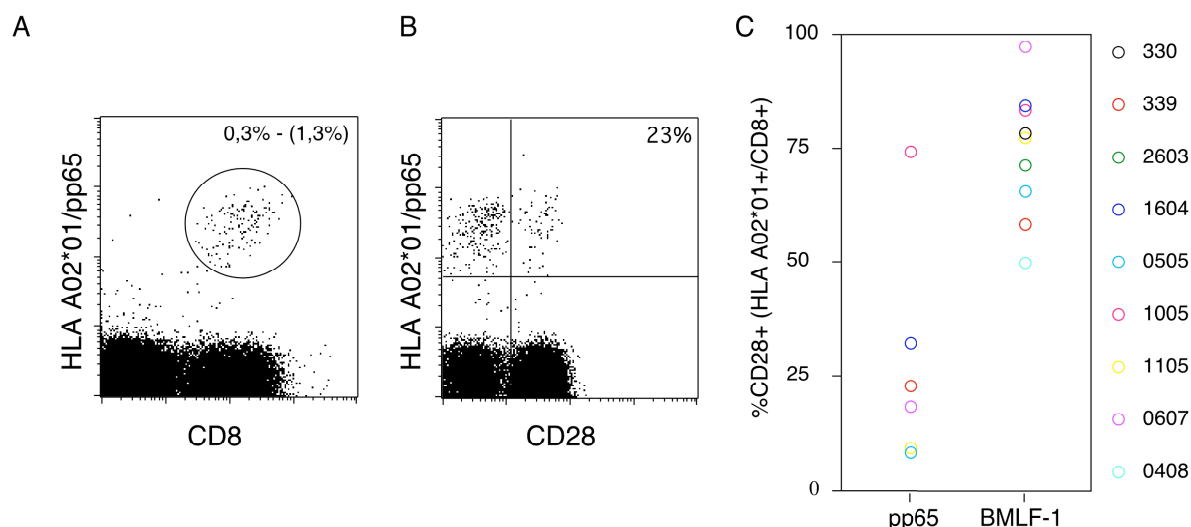


Figure 14. Caractérisation phénotypique des lymphocytes spécifiques à JO. A. Exemple de double marquage HLA-A*0201/pp65 et anti-CD8 réalisé sur des PBMC (DO 339). Le pourcentage en haut à droite indique la fréquence des cellules spécifiques parmi les PBMC totaux (soit 1,3% des T CD8+). B. Exemple de double marquage HLA-A*0201/pp65 et anti-CD28 réalisé sur des PBMC. Le pourcentage en haut à droite indique la fréquence des cellules CD28+ parmi les lymphocytes spécifiques. C. Représentation du statut CD28 des lymphocytes dirigés contre pp65 et BMLF-1 sur l'ensemble des donneurs testés.

3. Expression de 4-1BB sur les lymphocytes T spécifiques.

Nous avons montré dans le chapitre I que bien que l'induction du 4-1BB sur des T purifiés soit moins forte que sur des PBMC, l'ajout d'IL15 permettait d'augmenter significativement cette expression. Dans cette étude nous avons utilisé une stimulation non spécifique et peu physiologique par de l'anti-CD3. Nous avons montré que les lymphocytes T CD28-exprimaient mieux le 4-1BB que les CD28+. Constatant que les lymphocytes T anti-BMLF-1 sont majoritairement CD28+, nous avons voulu étudier l'expression du 4-1BB par les lymphocytes T CD8-purifiés en réponse à une stimulation antigénique spécifique. Nous avons donc stimulé en présence d'IL15 (20 ng/ml) les lymphocytes T purifiés de quelques donneurs par du HLA-A*0201/pp65 et BMLF-1 (tétramérisé par de la streptavidine non couplée). Au bout de 72h, nous avons analysé l'expression du 4-1BB sur les lymphocytes spécifiques par triple marquage tétramère HLA-A*0201/peptide (streptavidine couplée à l'APC), anti-CD8 (couplé FITC) et anti-4-1BB (couplé PE) (fig. 15).

Résultats

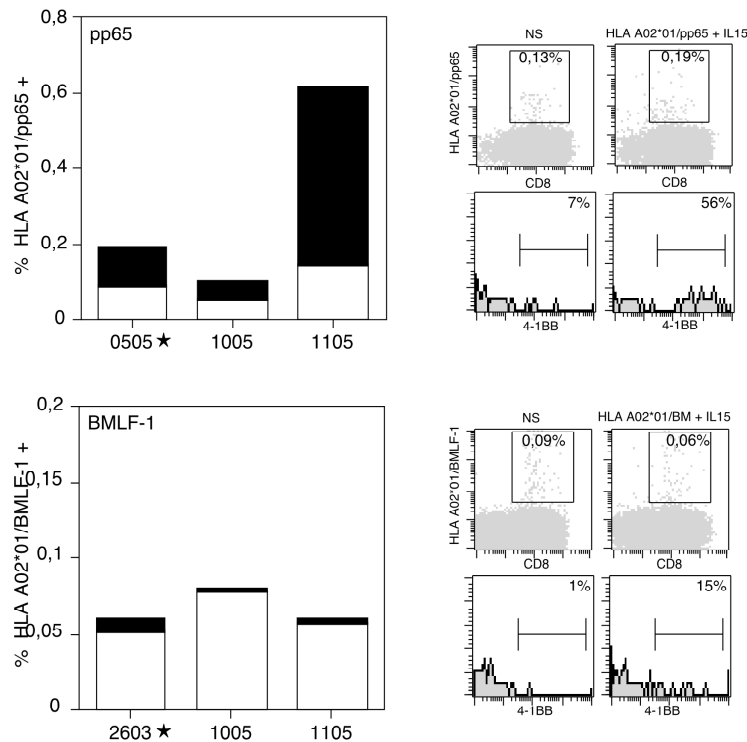


Figure 15. Expression du 4-1BB par les lymphocytes T spécifiques CD8-purifiés en réponse à une stimulation par du tétramère HLA-A*0201/peptide en présence d'IL15 (20 ng/ml). En haut, analyse dans le contexte HLA-A*0201/pp65, en bas, dans le contexte BMLF-1. La hauteur totale de l'histogramme représente le pourcentage de cellules spécifiques détectées à J3, la partie blanche, la proportion de cellules spécifiques 4-1BB- et en noir la proportion de cellules spécifiques 4-1BB+. Les numéros des donneurs suivis d'une ★ sont ceux présentés sur les images de FACS. Les « dot plot » représentent les double marquages HLA-A*0201/peptide-APC et CD8-FITC dans 2 conditions : non stimulés (NS) et stimulation spécifique en présence d'IL15. Le pourcentage indique la fréquence de cellules spécifiques détectées parmi les CD8+ sur lesquelles le marquage 4-1BB a été analysé (histogramme de FACS). Le pourcentage de cellules 4-1BB+ est indiqué en haut à droite des histogrammes de FACS.

Dans la plupart des cas la fréquence de cellule positive détectée à 72h est plus faible qu'avant stimulation (tableau V A et B). Il est possible que le tétramère couplé soit en compétition avec du tétramère non couplé ou que les cellules spécifiques aient internalisé leur TCR suite à l'activation.

La stimulation du TCR par du HLA recombinant permet à environ 50% des lymphocytes T spécifiques de pp65 d'exprimer le 4-1BB. Dans le contexte BMLF-1, l'expression du 4-1BB semble cependant faible suite à une stimulation de CD8 purifiés (fig. 15). Ces résultats nécessiteraient d'être élargis à un plus grand nombre de donneurs afin de conclure à une faible expression du 4-1BB qui pourrait être associée au statut CD28+ de ces cellules. En effet, pour les 3 donneurs testés, le pourcentage de cellules spécifiques analysé est parmi les plus faibles (0,03% pour le 2603 et 0,08% pour le 1005 et 0,06% pour le 1105). Ce pourcentage est soit

faible dès J0 (0,07% pour le 2603 et 0,06% pour le 1105) soit très diminué après la stimulation (0,36% avant stimulation et 0,08% à 72h pour le donneur 1005) (tableau VB).

A	JO	J3	
		NS	pp65+IL15
0505	0,24%	0,13%	0,19%
1005	0,42%	0,25%	0,1%
1105	3,3%	0,13%	0,61%

B	JO	J3	
		NS	BMLF-1+IL15
2603	0,07%	0,02%	0,03%
1005	0,36%	0,25%	0,08%
1105	0,06%	nd	0,06%

nd : not done

Tableau V. Evolution de la fréquence des cellules spécifiques parmi les T CD8⁺ au cours de la culture. A. Contexte pp65. B. Contexte BMLF-1. NS : fréquence des cellules spécifiques en l'absence de toute stimulation à J3.

C. Les billes

Nous avons utilisé des billes immunomagnétiques M280 recouvertes de streptavidine (Dyna). Elles ont une taille moyenne de 2 à 8 μm , sensiblement plus petites que des cellules, permettant à plusieurs billes de se fixer à un même lymphocyte. Elles ont cependant une taille suffisante pour être analysées par cytométrie et visualisées au microscope. De plus, leur caractère magnétique permet de les isoler rapidement sur aimant, ce qui permet de les laver au cours de leur préparation, puis de les éliminer des cultures cellulaires quand cela est souhaité. Afin d'utiliser ces billes de manière reproductible au cours des différentes expériences, nous avons entrepris de les calibrer.

1. Billes HLA/CD28

Il est indispensable que la stimulation du CD28 soit fournie conjointement à la stimulation du TCR (Liu *et al.*, 1992; Ding *et al.*, 1994). De ce fait, il fallait fabriquer des billes portant à la fois le signal HLA et le signal CD28. Il n'y a pas de données indiquant la proportion de signal CD28 à fournir par rapport au signal TCR pour une activation optimale. Nous avons donc choisi de délivrer autant de l'un que de l'autre. Il est difficile de prévoir a priori les concentrations utiles parce que l'anticorps anti-CD28 (BD Biosciences) est biotinylé chimiquement (il y a donc potentiellement une biotine fixée sur chaque lysine).

Nous avons établi un procédé de calibration des billes par une technique de marquage immunofluorescent afin de fixer sur les billes la même quantité de monomère de HLA-A*0201 et d'anti-CD28 biotinylé. Une quantité fixe de billes ($6,7 \cdot 10^4$) est incubée avec des

gammes de concentration de chaque constituant en duplicate. Sur un des deux échantillons, le monomère HLA est détecté par un anticorps anti-classe I (FITC) et sur l'autre, l'anti-CD28 est détecté par un anticorps anti-souris (FITC). Les MFI relatives pour chaque constituant sont calculées selon les formules suivantes :

$$\text{MFI HLA relative (x, y)} = \frac{\text{MFI HLA à la concentration x en présence de CD28 à la dilution y}}{\text{MFI HLA seul à la concentration x}}$$

$$\text{MFI CD28 relative (x, y)} = \frac{\text{MFI CD28 à la dilution y en présence de HLA à la concentration x}}{\text{MFI CD28 seul à la dilution y}}$$

Où x représente une des trois concentrations de HLA testées (1 µg/ml; 0,75 µg/ml; 0,5 µg/ml) et y représente une des trois dilutions de CD28 testées (1/20 ; 1/40 ; 1/80).

Pour la représentation graphique, la MFI relative du HLA est en abscisse et la MFI relative du CD28 est en ordonnée (fig. 16).

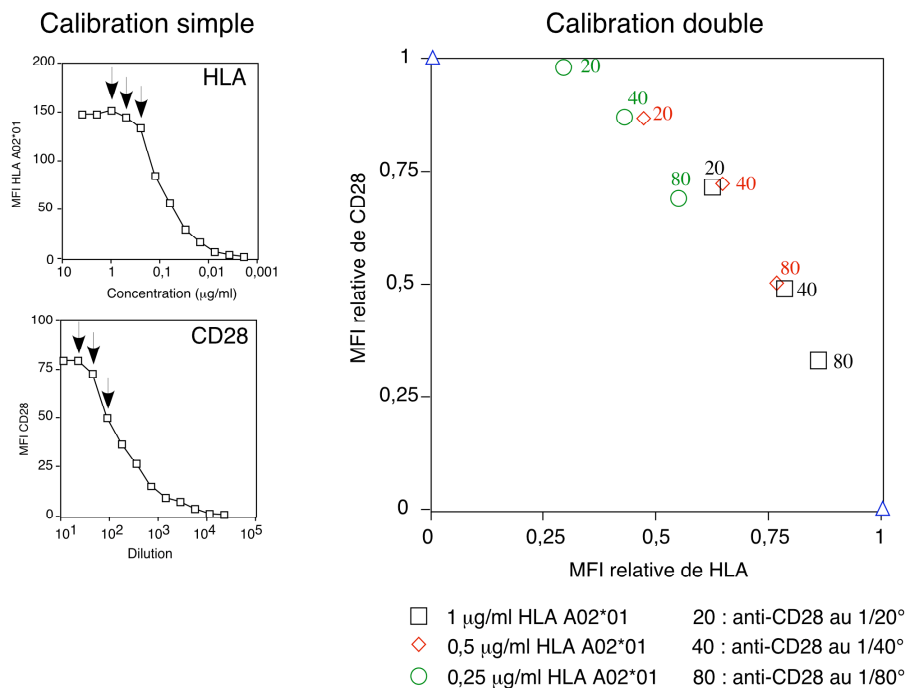


Figure 16. Calibration des billes avec le monomère HLA et l'anti-CD28. A gauche, sont présentées les courbes de saturation des billes par chacun des ligands en l'absence de compétiteur qui permettent d'établir le 100% de marquage pour chaque concentration. Les flèches indiquent les concentrations que nous avons utilisées pour les compétitions, présentées à droite.

Du fait de la compétition entre deux agonistes qui n'ont pas la même affinité pour le récepteur (*ie* la streptavidine liée aux billes), on n'obtient pas une droite. Les conditions d'utilisation **HLA-A*0201/peptide : 0,5 µg/ml et anti-CD28 1/40 (♦40)** permettent d'obtenir un marquage des billes équivalent pour le HLA et l'anti-CD28, ce qui suggère qu'une quantité approximativement équivalente de chaque ligand est fixée.

Ces conditions permettent de déterminer la quantité de chaque constituant à utiliser par bille, et donc de préparer des quantités de billes souhaitées.

2. Billes HLA/4-1BBL

Il n'y a pas de données indiquant si la stimulation du 4-1BB doit intervenir associée à une stimulation du TCR ou si elle peut agir indépendamment (*ie* fournie par un troisième intermédiaire). Le 4-1BB étant une molécule inductible, il est néanmoins *a priori* concevable de fournir ce signal de manière décalée dans le temps. Nous avons envisagé les deux possibilités : dans le premier cas, les billes HLA/4-1BBL sont fabriquées selon le même principe que les billes HLA /CD28. Dans le deuxième cas, les billes AviTag-4-1BBL sont ajoutées 6h après les billes HLA seul.

Le monomère HLA-A*0201/peptide et le trimère AviTag-4-1BBL sont tous les deux biotinylés enzymatiquement par l'enzyme birA. Cependant, pour l'AviTag4-1BBL, il est difficile de déterminer si les trois monomères sont tous biotinylés. Pour des raisons d'encombrement stérique, il est possible que l'enzyme de biotinylation (birA) n'ait pas accès à l'ensemble des peptides AviTag une fois le trimère constitué. Pour cette raison, nous avons également calibré les billes, selon un procédé très similaire à celui utilisé pour les billes HLA/CD28. L'analyse des billes par cytométrie est réalisée directement par double marquage avec un anticorps anti-classe I (FITC) et de l'anti-4-1BB (PE). Les MFI relatives de chaque constituant sont calculées comme pour la calibration des billes HLA/CD28 (fig. 17).

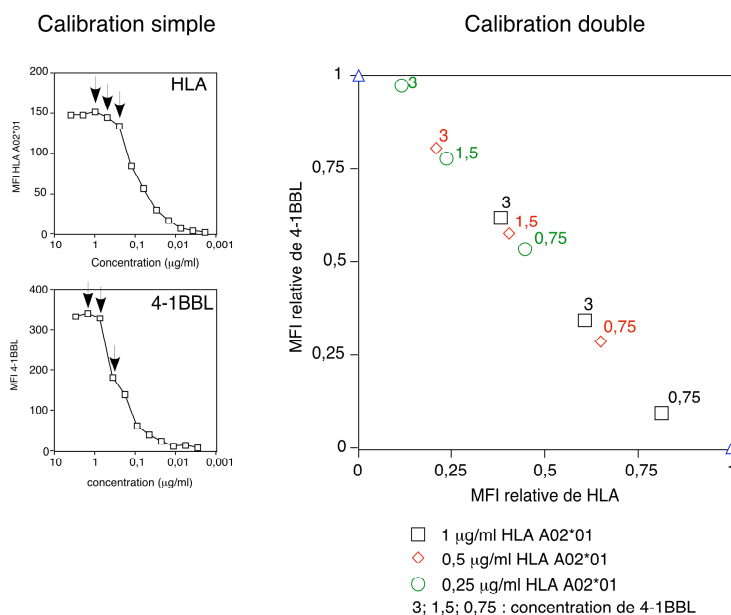


Figure 17. Calibration des billes HLA/AviTag-4-1BBL. A gauche, sont présentées les courbes de saturation des billes par chacun des ligands en l'absence de compétiteur. Les flèches indiquent les concentrations que nous avons utilisées pour les compétitions, présentées à droite.

Dans ce cas, la représentation graphique des gammes de concentrations testées permet d'obtenir une droite. Ceci illustre que le HLA et le 4-1BBL recombinant, biotinylés selon le même procédé, ont des affinités similaires pour la streptavidine. Pour fabriquer des billes ayant autant de chaque ligand fixé, nous retenons les concentrations suivantes : **HLA 0,5 $\mu\text{g/ml}$ et AviTag-4-1BBL : 1,5 $\mu\text{g/ml}$.**

3. Billes HLA seul

Pour fournir un signal 1 équivalent dans toutes les conditions, la dose de HLA utilisée est fixée à la dose donnant 50% du marquage obtenu à 0,5 $\mu\text{g/ml}$, c'est à dire : **0,125 $\mu\text{g/ml}$.**

D. Amplification obtenue selon les modèles étudiés

Nous avons testé le système d'amplification de lymphocytes T par des molécules recombinantes immobilisées sur des billes dans deux modèles : à partir de PBMC ou de T CD8 purifiés et en présence de différentes combinaisons de cytokines.

1. Amplification à partir de PBMC

Nous avons réalisé des expériences préliminaires d'amplification lymphocytaire dans les conditions les plus simples : nous avons co-cultivé les PBMC de 2 donneurs (DO 330 et 339) avec des billes HLA ou des billes HLA+4-1BBL. Les monomères HLA sont chargés en peptide issu des antigènes BMLF-1 ou pp65. L'IL2 est la cytokine la plus fréquemment utilisée pour cultiver les lymphocytes T ; nous avons donc évalué l'amplification des lymphocytes spécifiques en absence ou en présence d'IL2 (50 UI/ml). Ces doses d'IL2 sont plus faibles que les doses habituellement utilisées pour la culture des lymphocytes T (150 UI/ml), mais sont proches de celles utilisées dans d'autres modèles d'amplification de lymphocytes T spécifiques (Maus *et al.* utilisent par exemple 20UI/ml d'IL2, (Maus *et al.*, 2002)).

Sans IL2, les cellules prolifèrent très peu et à J14, il n'y a aucune expansion des lymphocytes T spécifiques (fig. 18A).

En présence de 50 UI/ml d'IL2, il y a une très forte expansion des lymphocytes T spécifiques (jusqu'à près de 50% des CD8 pour le DO 339), sauf pour le donneur 330 dans le contexte pp65. (fig. 18B). Cette absence d'amplification peut s'expliquer par la faible fréquence des cellules mémoires à J0 (indétectable par marquage tétramère) ou par le fait que l'épitope étudié issu de l'antigène pp65 n'est pas présenté par cet individu (Kern *et al.*, 2002). Bien qu'il y ait trop peu de donneurs pour conclure formellement, la co-stimulation par le 4-1BBL semble utile pour augmenter le pourcentage de cellules spécifiques.

Résultats

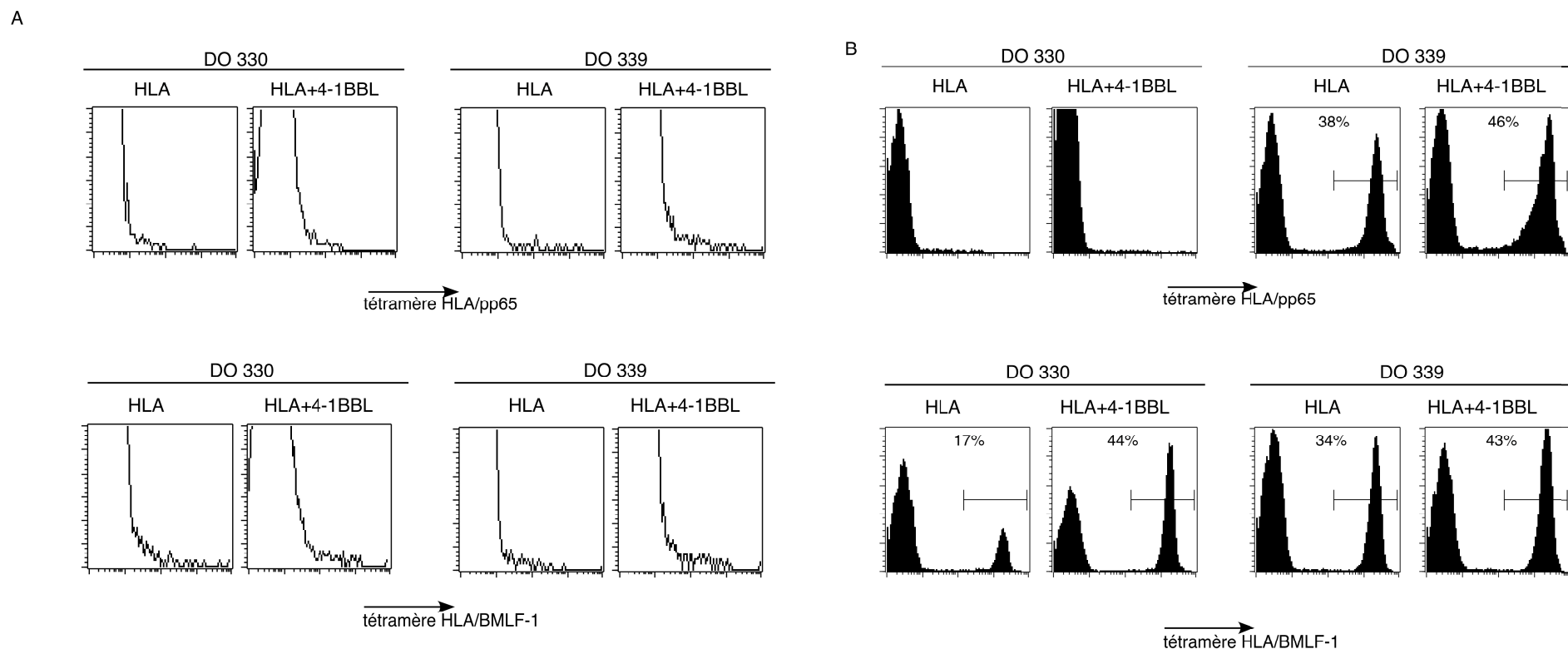


Figure 18. Amplification des lymphocytes T spécifiques à partir de PBMC. A. Marquage HLA/peptide à J14 sur les cellules de donneurs (DO 330 et 339) co-cultivées avec des billes HLA±4-1BBL en l'absence de cytokine. B. En présence d'IL2 (50UI/ml). Les pourcentages représentent le nombre de cellules spécifiques parmi l'ensemble des CD8+.

2. Amplification à partir de CD8 purifiés

Nous avons montré qu'à partir de PBMC, il était possible d'amplifier fortement les lymphocytes T spécifiques des antigènes pp65 et BMLF-1 à l'aide de billes. Cependant, conceptuellement, l'utilisation de PBMC pose quelques problèmes de standardisation et de reproductibilité. Tout d'abord, les molécules de co-stimulation exprimées par les monocytes/macrophages fournissent des signaux aux lymphocytes T et le 4-1BBL présents physiologiquement à leur surface peut entrer en compétition avec notre ligand. De plus, les monocytes/macrophages ont une forte tendance à phagocyter les billes (fig. 19), ce qui pose un problème de reproductibilité et qui mécaniquement, ne permet pas d'exclure une éventuelle présentation croisée.

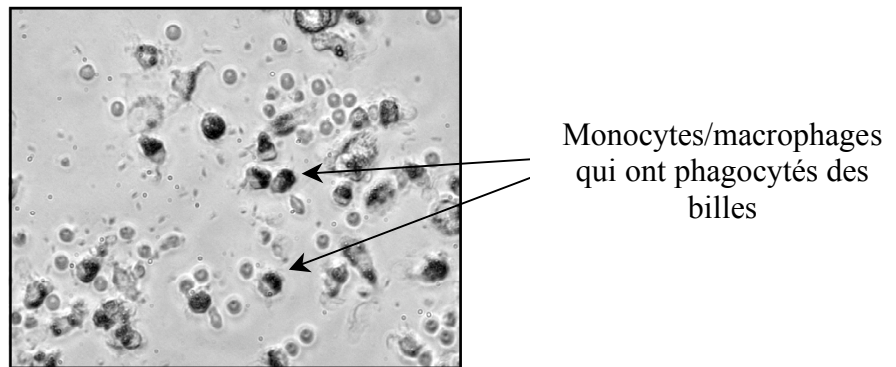


Figure 19. Photo des PBMC co-cultivés avec des billes, illustrant la phagocytose des billes par les cellules de la lignée monocyte/macrophage.

Travailler dans un modèle de CD8 purifiés permet également de n'évaluer que le rôle de co-stimulation du 4-1BB sur ces cellules sans avoir à tenir compte de son éventuel effet sur les cellules NK ou sur les monocytes/macrophages. La mise au point des conditions optimales d'amplification à partir de lymphocytes T CD8 purifiés présente aussi l'avantage d'enrichir la population de départ en lymphocytes à expandre, ce qui peut avoir un intérêt lorsque le pourcentage de cellules spécifiques à J0 est très faible - ce qui est souvent le cas dans le contexte tumoral par exemple (Anichini *et al.*, 1999).

Nous avons ajouté systématiquement de l'IL15 (20 ng/ml) à J0 afin de garantir une expression correcte du 4-1BB par la stimulation du TCR. L'IL2 est ensuite ajoutée à J3 (50 UI/ml), puis régulièrement au cours de la culture. A J14, les billes sont enlevées et les cellules sont numérées, puis marquées par du tétramère HLA/peptide.

La numération associée au marquage tétramère HLA-peptide permet de déterminer le nombre absolu de lymphocytes spécifiques amplifiés (produit du pourcentage de cellules spécifiques par le nombre total de cellules en culture).

a. Quand fournir le signal 4-1BBL ?

Nous avons montré dans un modèle de prolifération de lymphocytes T au repos par une stimulation CD3 que le signal 4-1BBL pouvait être fourni soit conjointement au signal 1 soit 24h après. Nous avons également testé ce paramètre pour l'amplification des lymphocytes T spécifiques des antigènes pp65 et BMLF-1. Pour cela nous avons comparé 2 séries d'expériences. Dans la première expérience, la stimulation a été effectuée par des billes portant à la fois des molécules de HLA et de 4-1BBL. Dans la deuxième expérience, la stimulation a été effectuée par des billes HLA seul d'abord puis des billes 4-1BBL ont été ajoutées 6 heures après.

Nous montrons que le signal 4-1BBL augmente le nombre de cellules spécifiques à J14, et que la stimulation du 4-1BB peut provenir d'un support différent de celui qui fournit le signal 1 spécifique (fig. 20). Pour la suite, nous avons préféré utiliser des billes portant les 2 molécules pour être dans les mêmes conditions de stimulation qu'avec l'anti-CD28 (même quantité de billes totales).

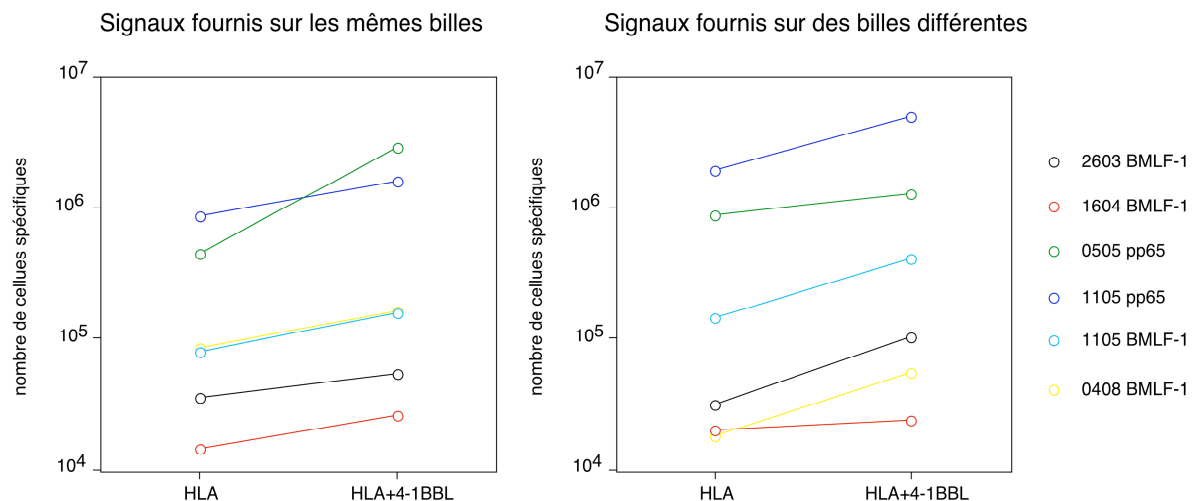


Figure 20. Le signal 4-1BBL peut être délivré indépendamment du signal HLA. Les lymphocytes spécifiques de BMLF-1 ou de pp65 de 5 donneurs différents ont été stimulés par des billes HLA en présence de 4-1BBL fournit soit sur les mêmes billes (à gauche) soit sur des billes différentes (à droite). Le nombre de cellules spécifiques est évaluée par comptage cellulaire associé à un marquage tétramère HLA/peptide.

b. Comparaison des stimulations HLA, HLA/CD28, HLA/4-1BBL

Afin de tenir compte de la variabilité inter-individuelle, nous avons étudié simultanément neuf donneurs. Pour chacun des donneurs séropositifs pour le CMV ou l'EBV, nous avons comparé le nombre de cellules spécifiques obtenues en stimulant les lymphocytes T triés CD8 avec des billes HLA, ou HLA/CD28 ou HLA/4-1BBL.

- Antigène pp65

A l'issue des 14 jours de stimulation, nous avons pu amplifier des lymphocytes T spécifiques de pp65 pour cinq donneurs sur six séropositifs pour le CMV avec un nombre de cellules spécifiques variable d'un donneur à l'autre, mais qui peut être très important (jusqu'à plus de 2.10^6 pour le DO 1105 par exemple) (tableau VI et fig. 21).

Pour amplifier des cellules mémoires anti-pp65, la stimulation par du HLA seul permet déjà d'obtenir une forte amplification des lymphocytes spécifiques (tableau VI et fig. 21).

A J0, les lymphocytes spécifiques de pp65 sont principalement CD28- (fig 14), nous n'attendions donc pas d'effet majeur de la co-stimulation par le CD28. De fait, la co-stimulation par le CD28 n'augmente que modérément le nombre de cellules spécifiques dans deux cas sur cinq, et faiblement par rapport à une stimulation HLA seul (au maximum 1,4 fois plus de cellules spécifiques, DO 339 et 1105) (tableau VI et fig. 21).

En revanche, la stimulation HLA/4-1BBL augmente efficacement le nombre de cellules spécifiques par rapport à une stimulation HLA dans quatre cas sur cinq (2,3 fois plus de cellules spécifiques en présence de 4-1BBL par rapport au HLA seul pour les donneurs 339 et 0505, 1,9 fois plus pour le donneur 1105, 1,3 fois pour le DO 1604) (tableau VI et fig. 21).

Il y a un donneur (0607) pour lequel les cellules s'amplifient très peu et pour lesquelles ni la co-stimulation par le 4-1BB ni la co-stimulation par le CD28 ne permettent d'augmenter le nombre de cellules spécifiques.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence statistiquement significative entre le nombre de cellules spécifiques obtenues avec des billes HLA ou des billes HLA/CD28 ou des billes HLA/4-1BBL, à cause de la grande variabilité inter-individuelle.

	Nombre absolu de cellules spécifiques de pp65 (moyenne±SEM) n= nombre d'expériences indépendantes			
	J0	J14		
Donneur		pp65	pp65+CD28	pp65+4-1BBL
330 (n=3)	indéetectable	Ne s'amplifie pas		
339 (n=1)	10 400	854 100	1 212 960	1 934 640
1604 (n=2)	2 635±200	74 170±26 430	89 850±33 750	97 790±19 390
0505 (n=3)	1 740±115	713 470±140320	712 830±85 310	1 643 700±663 325
1105 (n=3)	23 100±1 715	1 420 300±550 700	2 020 880±1 123 760	2 703 270±1 134 960
0607 (n=2)	1 450±200	165 530±35 480	155 510 (n=1)	155 700±41 700

Tableau VI. Nombre de lymphocytes T spécifiques de pp65 à J0 puis après 14 jours d'amplification par des billes HLA, HLA/CD28, HLA/4-1BBL (moyenne±SEM).

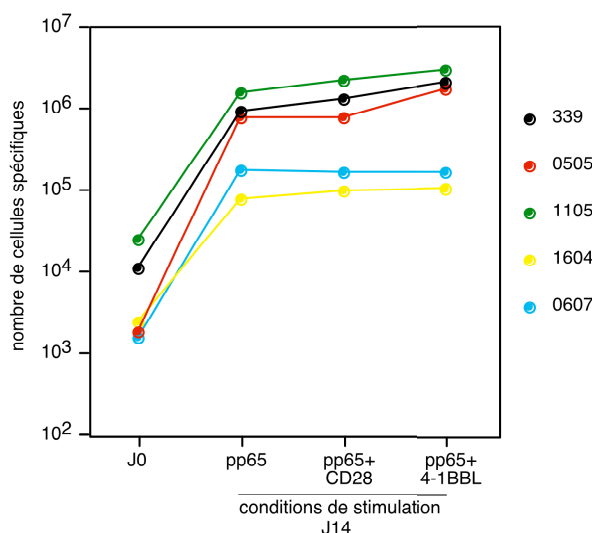


Figure 21. Nombre de cellules spécifiques dans les populations de départ et au bout de 14 jours de culture de lymphocytes T CD8 avec des billes HLA-pp65, HLA-pp65/CD28 ou HLA-pp65/4-1BBL.

- Antigène BMLF-1

Les lymphocytes dirigés contre l'épitope issu de BMLF-1 s'amplifient systématiquement (n=9). Il n'y a pas de corrélation entre le nombre de cellules spécifiques au départ et le nombre obtenu à J14 ; il est possible d'obtenir un grand nombre de lymphocytes en partant seulement de quelques centaines de cellules à J0 (tableau VII, DO 0505 et 1105).

Comme dans le contexte pp65, la stimulation par du HLA seul permet déjà d'obtenir une forte amplification des lymphocytes spécifiques (tableau VII). Globalement l'amplification des

cellules anti-BMLF-1 ne permet pas d'obtenir autant des lymphocytes spécifiques que dans le contexte pp65 (tableau VII et fig. 22).

Comme les lymphocytes sont majoritairement CD28+ à J0, nous nous attendions à ce que la stimulation par de l'anti-CD28 permette de générer des lymphocytes T en plus grand nombre. De fait, il n'y a pas de corrélation entre le statut CD28+ des lymphocytes à J0 et un bénéfice supérieur à utiliser de l'anti-CD28 (fig. 23). Par exemple, les lymphocytes des donneurs 330 et 1604 sont CD28+ à 78 et 83% respectivement et pourtant, le 4-1BBL est plus efficace que l'anti-CD28 pour amplifier ces cellules.

Néanmoins pour tous les donneurs il y a un intérêt à utiliser l'un ou l'autre des signaux de co-stimulation (tableau VII et fig. 22). Ainsi, les donneurs peuvent être classés en trois groupes :

1. ceux pour lesquels la co-stimulation la plus efficace est le CD28 (DO 0505, 1105, 0607)
2. ceux pour lesquels la co-stimulation la plus efficace est le 4-1BB (DO 330, 339, 1604, 0408)
3. celui pour lequel la co-stimulation par le CD28 ou le 4-1BB est également efficace (DO 1005, 2603).

	Nombre absolu de cellules spécifiques de BMLF-1 (moyenne±SEM) n= nombre d'expériences indépendantes			
	J0	J14		
Donneur		BMLF-1	BMLF-1+CD28	BMLF-1+4-1BBL
330 (n=3)	1 480±175	33 330±570 *	69 195±10 605*	93 370±19 780
339 (n=1)	2 720	147 900	150 000	487 410
2603 (n=3)	577±65	38 930±5 105	81 040±15 125	67 130±19 125
1604 (n=3)	8 233±690	34 180±16 554	49 150±34 285	108 880±83 330
0505 (n=3)	420±35	251 580±11 210	602 060±155 565	274 100±65 905
1005 (n=2)	2 720±160	129 650±22 330	1 275 850±490 835	1 132 775±659 096
1105 (n=2)	420±30	115 400±28 250	537 550±124 720	286 275±104 285
0607 (n=1)	490	17 190	323 260	120 020
0408 (n=2)	2 000±265	52 125±33 395	91 600 (n=1)	232 760±70 360

* : n=2

Tableau VII. Nombre de lymphocytes T spécifiques de BMLF-1 à J0 puis après 14 jours d'amplification par des billes HLA, HLA/CD28, HLA/4-1BBL (moyenne±SEM).

Résultats

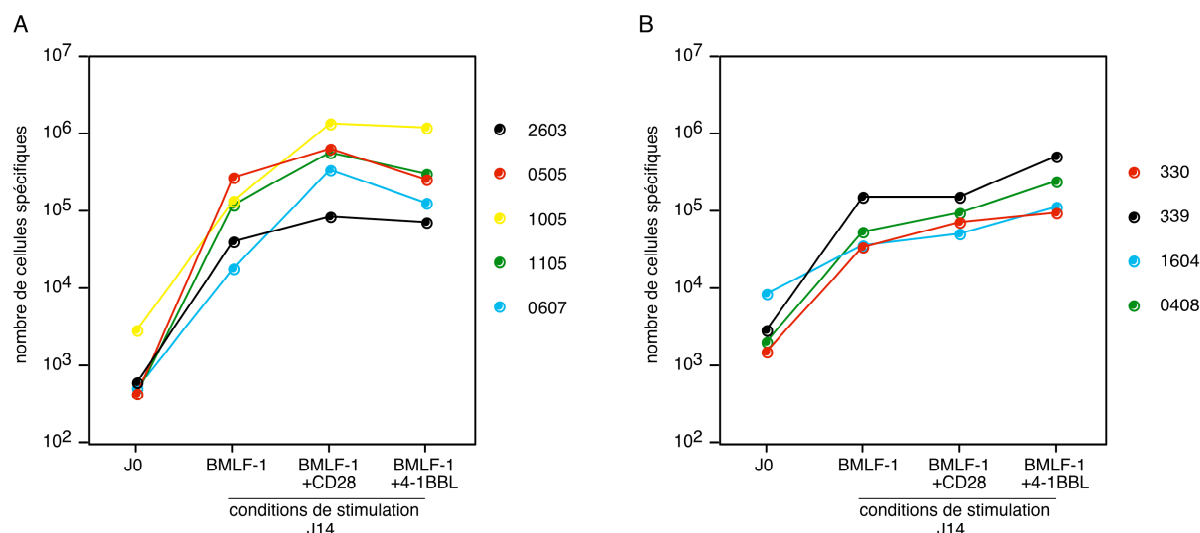


Figure 22. Nombre de cellules spécifiques dans les populations de départ et au bout de 14 jours de culture à partir de lymphocytes T CD8 purifiés avec des billes HLA-BMLF-1, HLA-BMLF-1/CD28 ou HLA-BMLF-1/4-1BBL. A gauche, les donneurs pour lesquels la co-stimulation par l'anti-CD28 est supérieure ou égale à la co-stimulation 4-1BBL. A droite, les donneurs pour lesquels la co-stimulation par le 4-1BBL est la plus efficace.

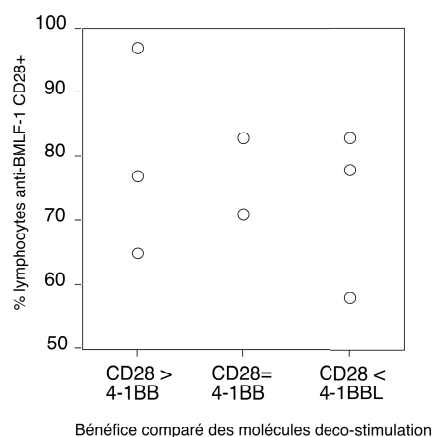


Figure 23. Absence de corrélation entre le statut CD28+ des lymphocytes anti-BMLF-1 à J0 et le bénéfice de la co-stimulation par de l'anti-CD28 pour amplifier plus de cellules spécifiques.

E. Caractérisation des cellules générées

Notre méthode d'expansion dans les contextes antigéniques viraux considérés permet d'obtenir de très fortes amplifications des lymphocytes spécifiques.

Les lymphocytes T spécifiques des antigènes pp65 et BMLF-1 présentés dans le contexte HLA-A*0201 sont bien caractérisés phénotypiquement et fonctionnellement. Les études qui ont permis ces caractérisations ont été réalisées à partir de sang périphérique d'individus séropositifs. Le répertoire contre les complexes HLA-peptide des épitopes pp65 et BMLF-1 auxquels nous nous intéressons est constitué d'un mélange de sous-populations ayant des caractéristiques phénotypiques différentes (Hislop *et al.*, 2001; van Leeuwen *et al.*, 2002). En nous appuyant sur les phénotypes décrits, nous avons étudié si notre mode de stimulation favorisait la prolifération d'une sous-population ou si elle aboutissait à une évolution vers un statut plus différencié. Nous avons donc étudié l'expression de quelques marqueurs phénotypiques ainsi que les caractéristiques fonctionnelles des cellules amplifiées à J14.

1. Analyse phénotypique des lymphocytes générés

a. CD28

Le premier marqueur dont nous avons suivi l'évolution est le CD28. En ciblant cette molécule par de l'anti-CD28 nous supposions amplifier préférentiellement les lymphocytes CD28+. En revanche, nous avons émis l'hypothèse que le 4-1BBL pouvait prendre le relais à la co-stimulation CD28 une fois celui-ci perdu en culture pour favoriser la prolifération de cellules CD28-. Cette analyse a pu être menée formellement puisque nous avons analysé le phénotype CD28 des lymphocytes spécifiques à J0.

Les lymphocytes pp65 sont principalement CD28- à J0 (fig. 14 et tableau VIII A). Après une stimulation par du HLA seul ou par du HLA/4-1BBL, il y a une augmentation significative du pourcentage de lymphocytes spécifiques CD28+ par rapport à J0 (augmentation significative entre J0 et J14 par une stimulation HLA, $p < 0,01$ et augmentation significative entre J0 et J14 par une stimulation HLA+4-1BBL $p < 0,05$ par une analyse de variance suivie d'un test de Tukey-Kramer). Cette augmentation est également documentée chez deux donneurs testés après une stimulation par du HLA/CD28, ce qui représente toutefois un nombre trop faible de donneur pour permettre une évaluation statistique (tableau VIII A et fig. 24).

Le pourcentage de lymphocytes anti-BMLF-1 CD28⁺ est également augmenté à J14 (sauf pour un donneur). Cette augmentation n'est cependant pas validée statistiquement, car le pourcentage de lymphocytes T CD28⁺ à J0 est déjà très élevé.

Ceci démontre donc que :

- i) les cellules ne perdent pas l'expression du CD28 au cours de la culture,
- ii) elles ont un avantage prolifératif par rapport aux CD28⁻,
- iii) La co-stimulation par le 4-1BBL ne favorise pas l'émergence d'une population CD28⁻.

Il semble donc que suite à première re-stimulation *ex vivo* des lymphocytes T spécifiques mémoires, la population obtenue n'a pas les mêmes caractéristiques phénotypiques que les lignées polyclonales ou les clones T générés par des restimulations non spécifiques (PHA). Ces résultats sont cohérents avec le modèle proposé par Appay *et al.* qui suggère que les cellules CD28⁺, moins différenciées que les CD28⁻, ont des capacités prolifératives plus importantes (Appay *et al.*, 2002a).

A

Donneur	J0	J14		
		pp65**	pp65+ CD28	pp65+ 4-1BBL*
339	23 %	38 %	nd	40 %
1604	32 %	74 %	nd	63 %
0505	8 %	13 %	15 %	17 %
1105	10 %	38 %	27 %	29 %
0607	18 %	40 %	nd	24 %

★★ : p<0,01 et ★ :p<0,05

B

Donneur	J0	J14		
		BMLF-1	BMLF-1+ CD28	BMLF-1+ 4-1BBL
330	78 %	94 %	79 %	74 %
339	58 %	85 %	nd	81 %
2603	71 %	58 %	37 %	52 %
1604	83 %	91 %	nd	81 %
0505	65 %	95 %	90 %	90 %
1105	77 %	77 %	nd	84 %
0408	49 %	91 %	nd	94 %

Tableau VIII. Evolution du statut CD28 au cours de l'amplification selon les différentes stimulations. A. Contexte pp65, et B. Contexte BMLF-1.

Résultats

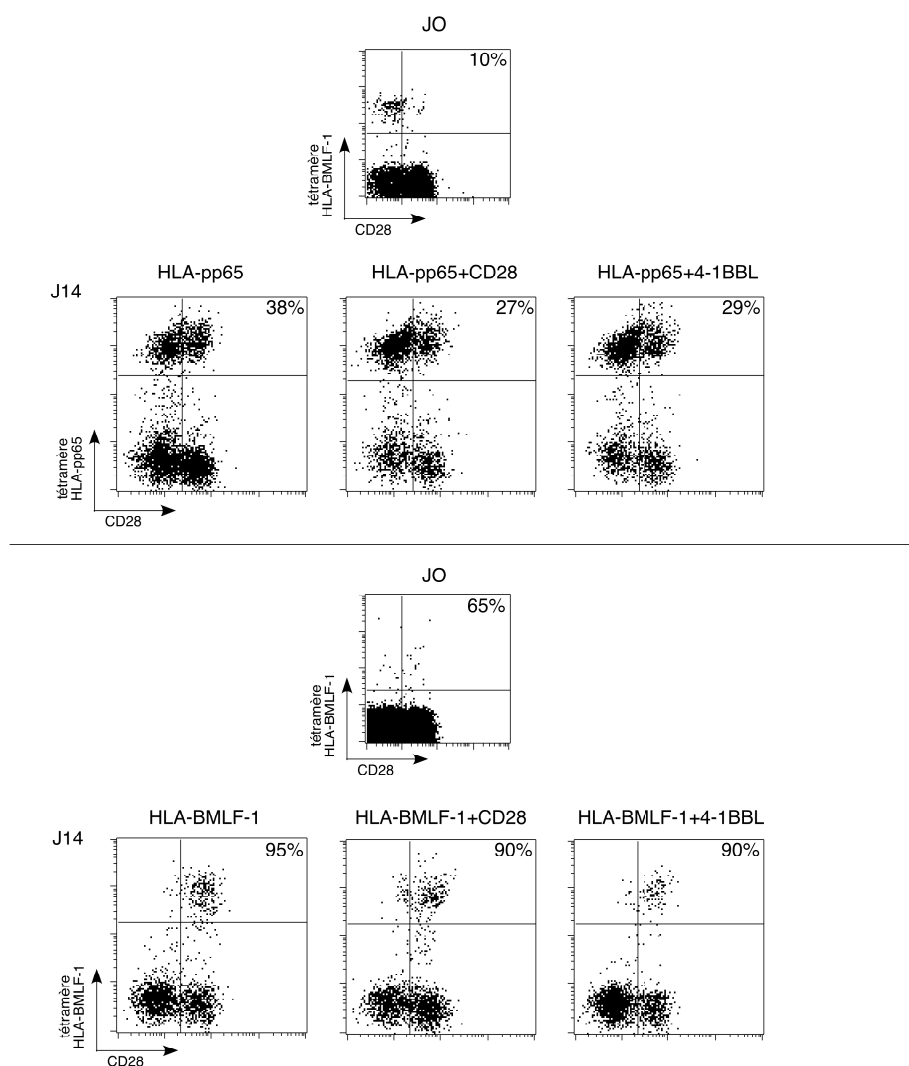


Figure 24. Evolution du statut CD28 par la stimulation HLA, HLA/CD28 et HLA/4-1BBL. Exemple d'un donneur dans le contexte pp65 et BMLF-1.

b. CCR7/CD62L

Selon la classification de Sallusto *et al.* établie à partir de l'analyse de populations T CD4, les cellules CD62L⁻/CCR7⁻ sont des lymphocytes effecteurs mémoires (T_{EM}) localisés principalement dans les tissus périphériques et qui n'ont pas la capacité de migrer vers les ganglions lymphatiques (Sallusto *et al.*, 1999). Par extension, cette classification est souvent utilisée pour les lymphocytes T CD8. En réalisant des triple marquages HLA-A*0201-peptide/CCR7/CD62L, nous montrons que quel que soit l'antigène ciblé et le mode de stimulation, les lymphocytes générés sont CCR7⁻ (fig. 25). Le marquage CD62L sur les lymphocytes non spécifiques permet de distinguer trois populations (CD62L neg, CD62L positif élevé, CD62L positif faible). Une proportion variable de lymphocytes spécifiques est CD62L⁺, mais avec une moyenne de fluorescence faible (fig. 25 et tableau IX).

A

stimulation donneur	pp65 (%CCR7-/CD62L+)	pp65+CD28 (%CCR7-/CD62L+)	pp65+4-1BBL (%CCR7-/CD62L+)
339	17%	nd	15%
0505	25%	29%	26%
1105	21%	16%	17%
0607	30%	nd	24%

B

stimulation donneur	BMLF-1 (%CCR7-/CD62L+)	BMLF-1+CD28 (%CCR7-/CD62L+)	BMLF-1+4-1BBL (%CCR7-/CD62L+)
330	12%	19%	10%
339	33%	nd	29%
0505	23%	37%	28%
1105	22%	nd	27%
0408	nd	nd	29%

Tableau IX. Pourcentage de lymphocytes spécifiques CCR7-/CD62L+ dans les différentes conditions de stimulation. A. antigène pp65. B. antigène BMLF-1.

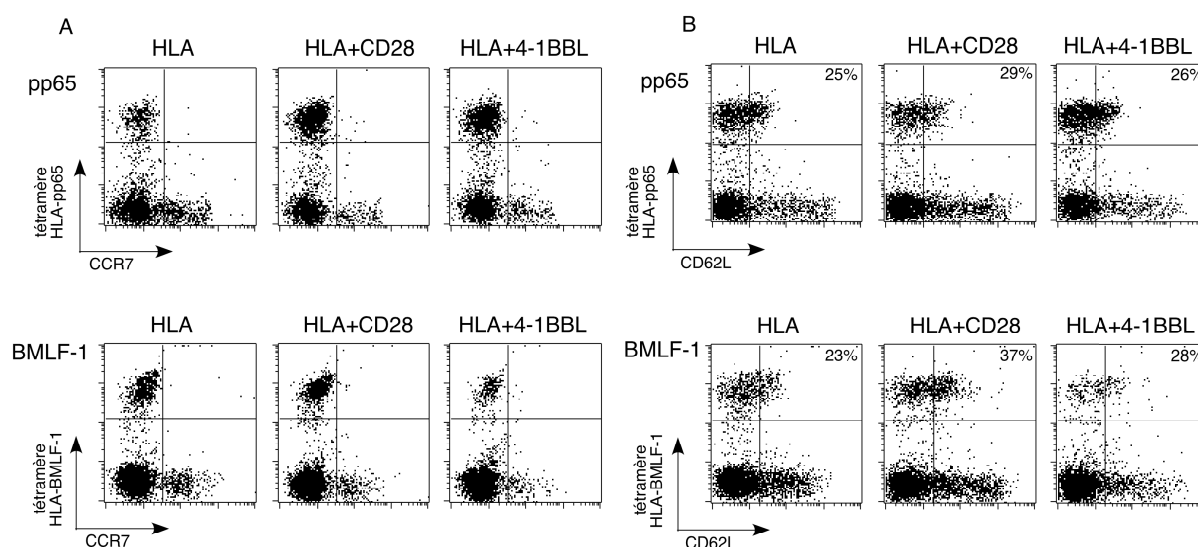


Figure 25. Analyse phénotypique des lymphocytes spécifiques amplifiés dans les 2 contextes antigéniques pp65 et BMLF-1 et dans les différentes conditions de stimulation : CD62L/CCR7. A. CCR7 et tétramère HLA-peptide (DO 0505). B. CD62L et tétramère HLA-peptide (DO 0505). Les pourcentages indiquent la proportion de lymphocytes CD62L+ parmi les lymphocytes spécifiques.

c. CD45RA/CD45RO

L'expression des marqueurs CD45RA et CD45RO reflète également le degré de différenciation des lymphocytes. Nous avons effectué des double marquages tétramère HLA-peptide/CD45RA et tétramère HLA-peptide/CD45RO.

Les lymphocytes T anti-pp65 et anti-BMLF-1 analysés à J14 sont quasiment totalement CD45RO+ (tableau X A et B et fig. 26).

Les lymphocytes spécifiques de pp65 sont soit totalement CD45RA- (DO 339, 1604 et 0607 stimulé par du HLA) soit hétérogène pour l'expression du CD45RA : de 17 à 34% des cellules sont CD45RA+ (DO 0505, 1105 et 0607 stimulé par HLA+4-1BBL) (tableau X A et fig. 26). Chez ces donneurs, les cellules analysées sont CD45RO+ et il est difficile de distinguer nettement la population CD45RA+ de la population CD45RA- (fig. 26). Il serait donc justifié de réaliser des triples marquages tétramère/CD45RO/CD45RA pour déterminer si ces lymphocytes T sont double positifs CD45RA/CD45RO.

Les cellules spécifiques de BMLF-1 analysées (n=5) sont CD45RA- (tableau X B et fig. 26).

Les études de la littérature indiquent que les lymphocytes T anti-pp65 directement issus du sang périphérique expriment plus de CD45RA que les lymphocytes T anti-BMLF-1 ($63,2 \pm 7,9\%$ des lymphocytes T anti-pp65 sont CD45RA+/CCR7- vs. $30,9 \pm 6,4\%$ des lymphocytes anti-BMLF-1) (Sauce *et al.*, 2003). Nous retrouvons cette différence à J14, mais elle est décalée vers un phénotype plutôt CD45RA-/CD45RO+ ($10,8 \pm 5,4\%$ des lymphocytes anti-pp65 stimulés par du HLA et $10,5 \pm 4,2\%$ stimulés par du HLA+4-1BBL sont CD45RA+ vs. $4,5 \pm 2,4\%$ des lymphocytes T anti-BMLF- stimulés par du HLA et $4,5 \pm 2,7\%$ stimulés par du HLA+4-1BBL. Une analyse de variance montre qu'il n'y a pas de différence significative entre le pourcentage de lymphocytes T pp65 CD45RA+ et le pourcentage de lymphocytes T anti-BMLF-1 CD45RA+ à J14). Comme nous ne disposons pas du phénotype de ces donneurs à J0, il n'est pas possible de conclure formellement, mais ces résultats suggèrent que notre mode de stimulation favorise la prolifération des effecteurs les moins différenciés. Cette évolution vers un phénotype plus CD45RA- est cohérente avec l'évolution vers un statut plus CD28+ que nous avons documenté précédemment.

A

	pp65	pp65+CD28	pp65+4-1BBL
339	2%/98%	nd/nd	1,4%/98%
1604	0%/100%	nd/nd	0%/100%
0505	19%/96%	34%/90%	13%/99%
1105	28%/nd	21%/nd	21%/nd
0607	5%/100%	nd/nd	17%/100%
MoyenneCD45RA+±SEM	10,8±5,4%		10,48±4,19%

% CD45RA+/%CD45RO+

B

	BMLF-1	BMLF-1+CD28	BMLF-1+4-1BBL
330	0%/100%	0%/100%	0%/100%
339	1,4%/99,8%	nd/nd	1,8%/100%
1604	0%/99%	nd/nd	0%/98%
0505	2%/97%	1%/97%	8%/83%
1105	10%/nd	nd/nd	14%/nd
MoyenneCD45RA+±SEM	4,48±2,36		4,46±2,73%

% CD45RA+/%CD45RO+

Tableau X. Phénotype CD45RA et CD45RO des lymphocytes T amplifiés. A. Antigène pp65. B. Antigène BMLF-1.

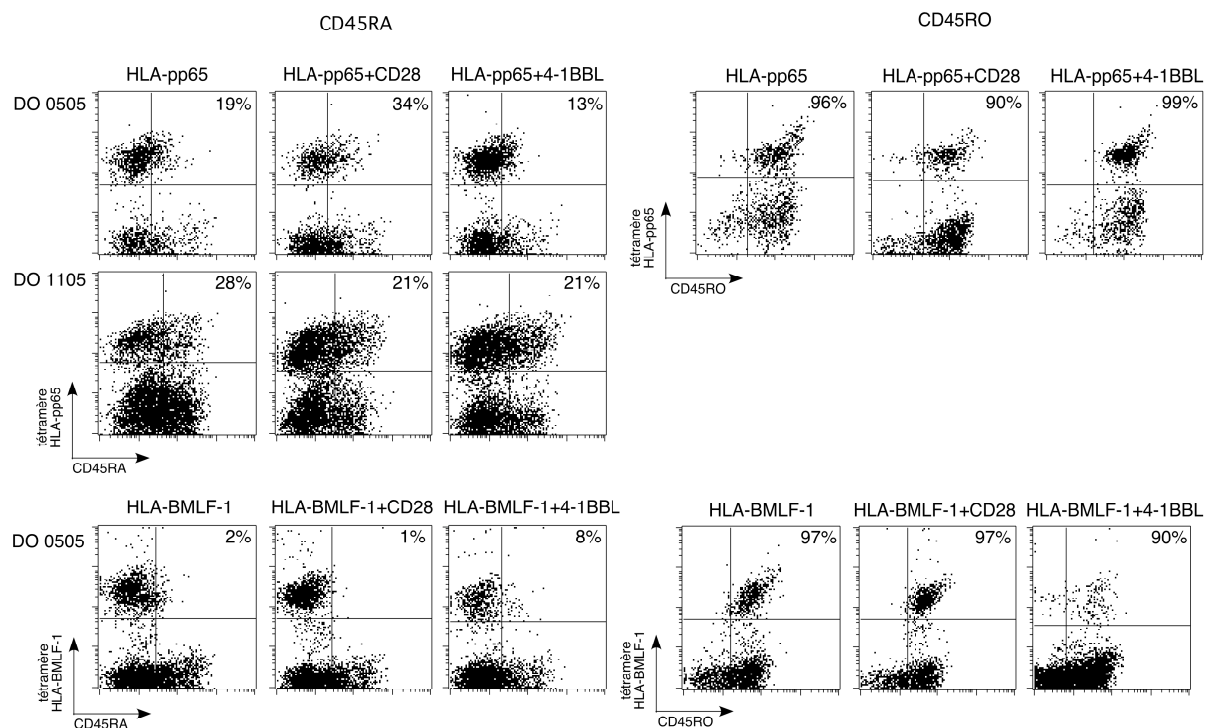


Figure 26. Phénotype CD45RA et RO, exemple de 2 donneurs représentatifs (DO 0505 et 1105).

d. CD27

Le marqueur CD27 est exprimé différenciellement par les lymphocytes T anti-pp65 et anti-BMLF-1 analysés à partir du sang périphérique : les lymphocytes anti-pp65 sont plutôt CD27- alors que les lymphocytes anti-BMLF-1 plutôt CD27+ (Hislop *et al.*, 2001; Appay *et al.*, 2002a; van Leeuwen *et al.*, 2002).

Parmi les donneurs que nous avons analysés (n=4 pour pp65 et n=5 pour BMLF-1), nous montrons que cette différence est conservée suite à une re-stimulation spécifique *in vitro* : selon les donneurs, de 16 à 56% des lymphocytes anti-pp65 et de 68 à 90% des lymphocytes anti-BMLF-1 sont CD27+ (tableau XI A et B et fig. 27). La présence de signaux de co-stimulation ne semble pas influencer cette répartition.

A

	pp65	pp65+CD28	pp65+4-1BBL
339	45%	nd	56%
0505	nd	21,5%	nd
1105	21%	34%	31%
0607	16%	nd	17%

(%CD27+)

B

	BMLF-1	BMLF-1+CD28	BMLF-1+4-1BBL
330	90%	76%	71%
339	78%	nd	69%
1604	82%	nd	77%
0505	68%	75%	83%
1105	72%	nd	83%

(%CD27+)

Tableau XI. Phénotype CD27 des lymphocytes T amplifiés. A. Antigène pp65. B. Antigène BMLF-1.

Résultats

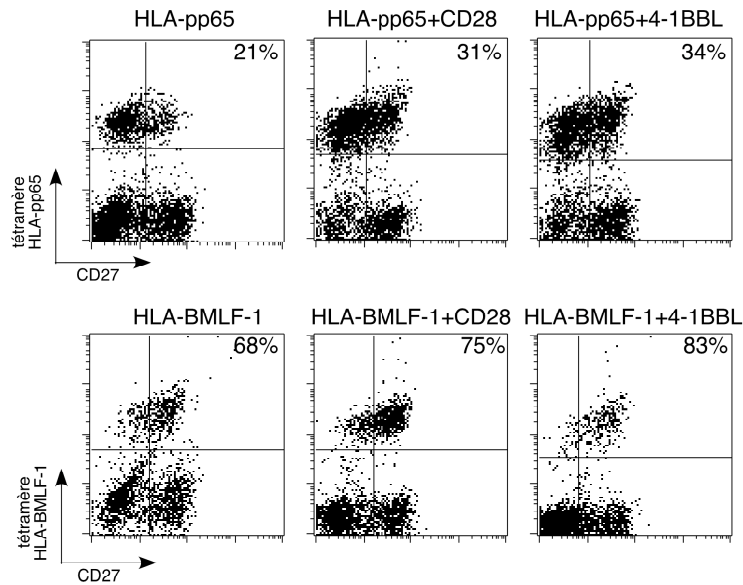


Figure 27. Analyse phénotypique du marqueur CD27.

Nous avons étudié les caractéristiques phénotypiques des lymphocytes T spécifiques mémoires amplifiés sur la base des marqueurs CD28, CCR7, CD62L, CD45RA CD45RO et CD27. Ces analyses ont été réalisées après 14 jours d'une re-stimulation spécifique *in vitro*. Les lymphocytes T obtenus sont tous CCR7-, alors qu'une proportion variable d'entre eux exprime un faible niveau de CD62L.

Nous avons montré que cette stimulation génère des lymphocytes qui sont plus CD28+ à J14 qu'à J0 ; cette évolution est statistiquement significative dans le contexte pp65 pour lequel les lymphocytes sont majoritairement CD28- à J0 (tableau VIII A et fig. 14). Nos résultats suggèrent également que quel que soit le contexte antigénique étudié, les cellules amplifiées expriment moins le CD45RA que la population de cellules mémoires trouvée dans le sang périphérique (Sauce *et al.*, 2003) et (tableau X A et fig. 26). Les lymphocytes CD28+/CD45RA- ont donc un avantage prolifératif global dans ce système de stimulation.

Malgré cet avantage prolifératif, le phénotype des lymphocytes reste hétérogène selon l'antigène considéré, en particulier sur la base du marqueur CD27. Il serait donc utile de réaliser des marquages multiples comme tétramèreHLA/CD28/CD27 afin de déterminer plus précisément les caractéristiques de la sous-population dominante en culture.

2. Analyse fonctionnelle des lymphocytes générés

L'analyse phénotypique d'un certain nombre de marqueurs renseigne sur le degré de différenciation des lymphocytes. Nous avons mis en évidence que notre mode de stimulation favorisait l'amplification des lymphocytes mémoires à un stade précoce de la différenciation. Cependant, les données de la littérature suggèrent qu'il n'y a pas relation directe entre le phénotype des lymphocytes et leurs fonctions effectrices (Hislop *et al.*, 2001; Appay *et al.*, 2002a). Les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8 se caractérisent par leur capacité à lyser une cellule cible et à produire des cytokines comme l'IL2, l'IFN- γ ou le TNF- α . A l'heure actuelle, ce sont principalement ces critères qui sont retenus pour sélectionner les lymphocytes T CD8 destinés aux protocoles d'immunothérapie (Vignard *et al.*, 2005).

Nous avons donc étudié les caractéristiques fonctionnelles des lymphocytes T amplifiés par notre mode de stimulation : leur capacité cytotoxique vis à vis d'une cible chargée en antigène, leur contenu en vésicules de perforine préformée et leur capacité à sécréter de l'IFN- γ et de l'IL2 en réponse à une re-stimulation antigénique.

a. Capacité cytotoxique

La capacité cytotoxique des lymphocytes T a été évaluée en mesurant la lyse de la lignée T2 chargée en Cr⁵¹ et en peptide antigénique. Nous avons réalisé cette mesure pour deux donneurs différents stimulés dans les trois conditions (HLA, HLA/CD28, HLA/4-1BBL) et pour les deux contextes antigéniques pp65 et BMLF-1. Les cibles ont été chargées soit avec le peptide spécifique, soit avec l'autre peptide étudié qui sert de témoin négatif (fig. 28).

Les lymphocytes obtenus sont très cytotoxiques vis à vis de l'antigène pp65. Au ratio 30/1 (trente lymphocytes totaux pour une T2 chargée), la lyse est quasiment totale, même lorsque les lymphocytes spécifiques ne représentent qu'environ 20% des lymphocytes totaux ($88 \pm 8\%$ pour le DO 0505 stimulé HLA et $88 \pm 4\%$ pour le même donneur stimulé HLA/CD28) (fig. 28).

Pour l'antigène BMLF-1, lorsque le pourcentage de cellules spécifiques est élevé (15%), la présence de cellules très cytotoxiques est détectée ($82 \pm 5\%$ de lyse pour le DO 0505 stimulé HLA et $90 \pm 4\%$ pour ce même donneur stimulé HLA/CD28). Quand le pourcentage de cellules spécifiques est plus faible (entre 2% et 6%), il n'est plus possible de distinguer une lyse spécifique parmi le bruit de fond (DO 0505 stimulé HLA/4-1BBL et DO 2603) (fig. 28).

Résultats

Nous n'avons pas vérifié dans ces cas précis s'il y avait un maintien ou une amplification des lymphocytes anti-pp65 qui pourrait expliquer cette cytotoxicité. Cependant cette hypothèse est peu probable car le donneur 2603 est séronégatif pour le CMV et les lymphocytes naïfs ne s'amplifient par ce mode de stimulation (non présenté).

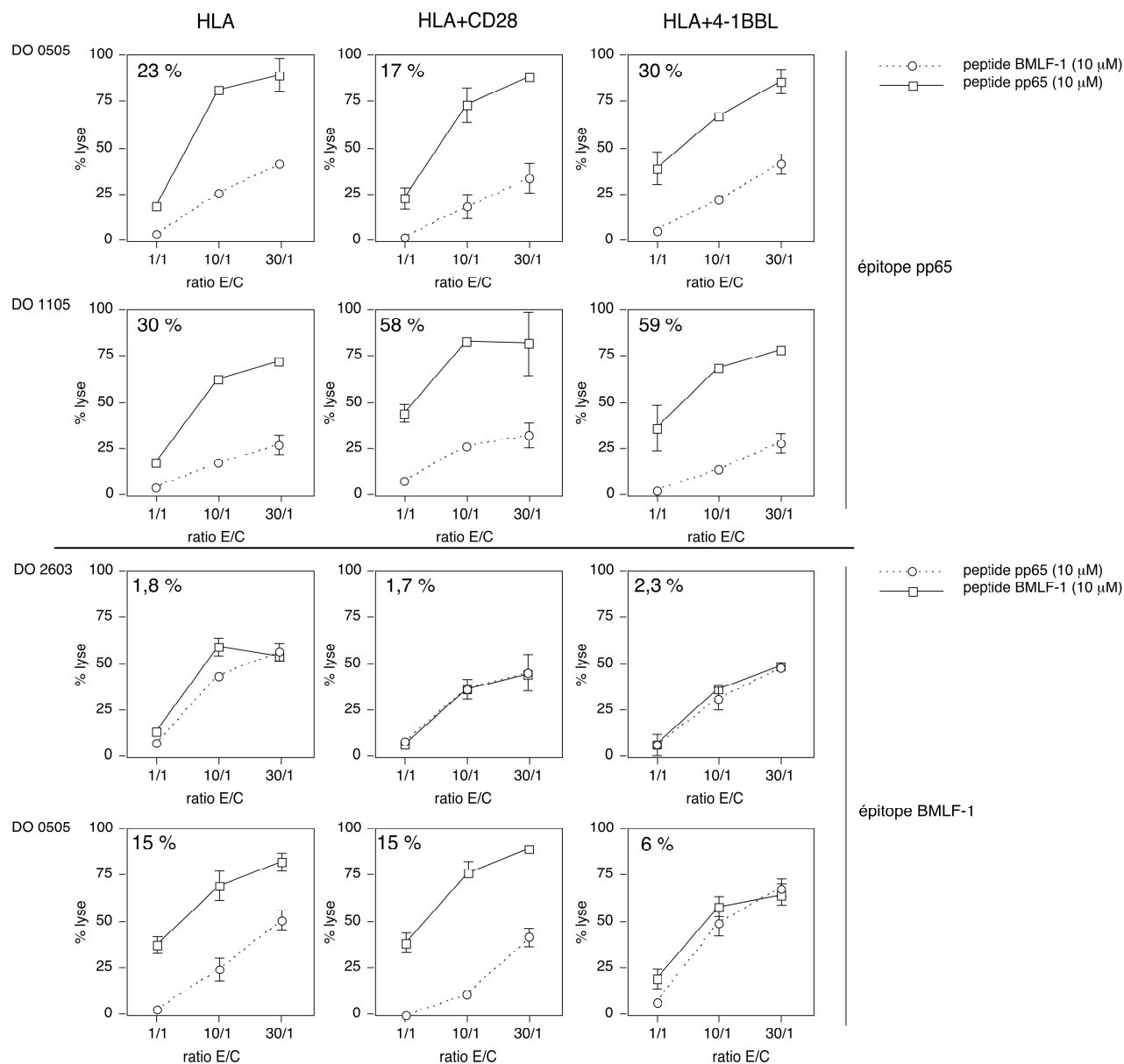


Figure 28. Capacité cytotoxique des lymphocytes générés contre la lignée T2 chargée en peptide. Les pourcentages de cellules spécifiques correspondantes sont indiquées en haut à gauche de chaque graphique. Le ratio E/C correspond au nombre de lymphocytes T totaux pour 1 cellule T2.

b. Perforine

Selon Appay *et al.*, il y a trois niveaux d'expression de la perforine : élevé, intermédiaire et faible (Appay *et al.*, 2002a). Pour détecter les vésicules de perforine préformées, nous avons réalisé un marquage intra-cytoplasmique sans pré-activation des lymphocytes (associé à un marquage membranaire par du HLA-peptide). Cette analyse évalue le potentiel cytotoxique des lymphocytes spécifiques, à la différence de la mesure de libération de Cr⁵¹ qui évalue véritablement les fonctions cytotoxiques des lymphocytes vis à vis d'une cible déterminée.

Bien que nous ayons du mal à distinguer les différentes catégories, les lymphocytes spécifiques sont positifs mais leur moyenne de fluorescence n'est pas maximale par rapport aux cellules non spécifiques perforine+ (tableau XII et fig. 29).

Ces résultats suggèrent qu'en culture, des lymphocytes contenant plus de perforine que les lymphocytes que nous cherchons à amplifier survivent. Il est possible que l'IL15 exerce sur ces cellules un rôle de facteur de survie en absence de stimulation antigénique (Goldrath *et al.*, 2002).

La moyenne de fluorescence intermédiaire des lymphocytes spécifiques est un élément cohérent au regard de leur phénotype CD28+/CD45RA- : les lymphocytes moins différenciés sont décrits comme moins cytotoxiques (contenant moins de perforine) que les lymphocytes en phase terminale de différenciation CD28-/CD45RA+.

A

	pp65	pp65+ CD28	pp65+ 4-1BBL
330	23(46)	24(51)	27(45)
1604	22(37)	nd	18(46)
0505	25(34)	24(36)	26(35)
1105	18(21)	19(29)	21(27)
0607	18(35)	nd	16(35)

B

	BMLF-1	BMLF-1+ CD28	BMLF-1+ 4-1BBL
1604	27(37)	nd	30(49)
0505	25(39)	27(31)	24(34)
1105	16(22)	nd	16(33)
0408	10(16)	nd	14(23)

Tableau XII. Intensité du marquage perforine des cellules spécifiques. **MFI des cellules spécifiques** (MFI des cellules non spécifiques perforine +).

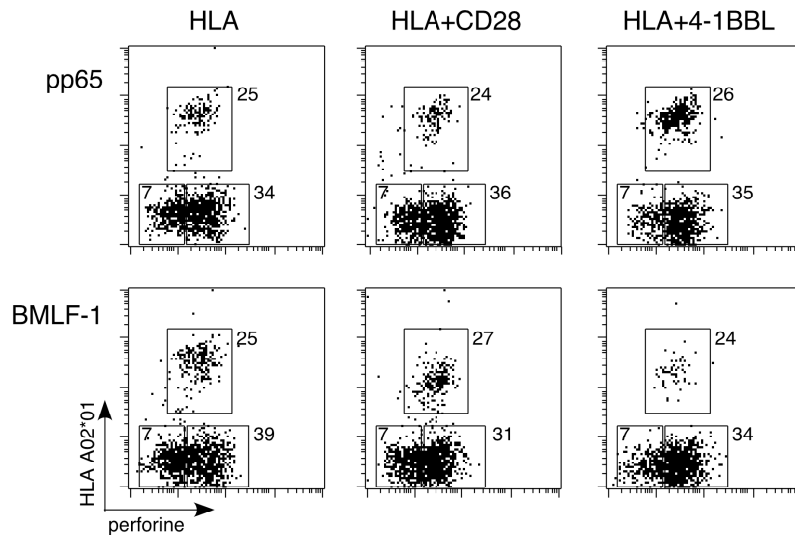


Figure 29. Double marquage HLA-A*0201/peptide membranaire et perforine intracytoplasmique. Exemple d'un donneur (0505). Le chiffre à côté de chaque quadrant indique la moyenne de fluorescence.

c. Sécrétion de cytokines : IL2 et IFN- γ

Nous avons évalué la capacité des cellules à sécréter de l'IFN- γ et de l'IL2 par marquage intra-cytoplasmique en réponse à la lignée T2 chargée en peptide (pp65 et BMLF-1, l'un servant de contrôle négatif pour l'autre). Nous avons étudié les lymphocytes spécifiques de deux donneurs dans le contexte pp65 (0505 et 1105) et de 1 donneur pour BMLF-1 (0505) stimulés dans les trois conditions (HLA, HLA/CD28, HLA/4-1BBL) (fig. 30).

Par rapport au pourcentage de cellules spécifiques, une proportion variable de lymphocytes sécrète des cytokines (par exemple parmi 23% de cellules spécifiques chez le DO 0505, 11,8% de lymphocytes stimulés HLA sécrètent des cytokines - 5,4% sécrètent de l'IFN- γ et de l'IL2 et 6,4% ne sécrètent que de l'IFN- γ) (fig. 30).

Cette méthode d'évaluation permet de distinguer deux populations : une population « double positive » qui sécrète à la fois de l'IFN- γ et d'IL2 et une population qui ne sécrète que de l'IFN- γ . La répartition entre ces deux populations est variable ; sur les trois donneurs testés, elle ne semble pas associée à une condition de stimulation particulière. Elle est généralement équivalente, comme pour le DO 0505 stimulé BMLF-1 ou en faveur de la population qui ne sécrète que de l'IFN- γ , comme pour le DO 0505 stimulé pp65+ CD28. Dans un cas, elle est en faveur de la population double positive (DO 0505 stimulé BMLF-1+CD28) (fig. 30).

Résultats

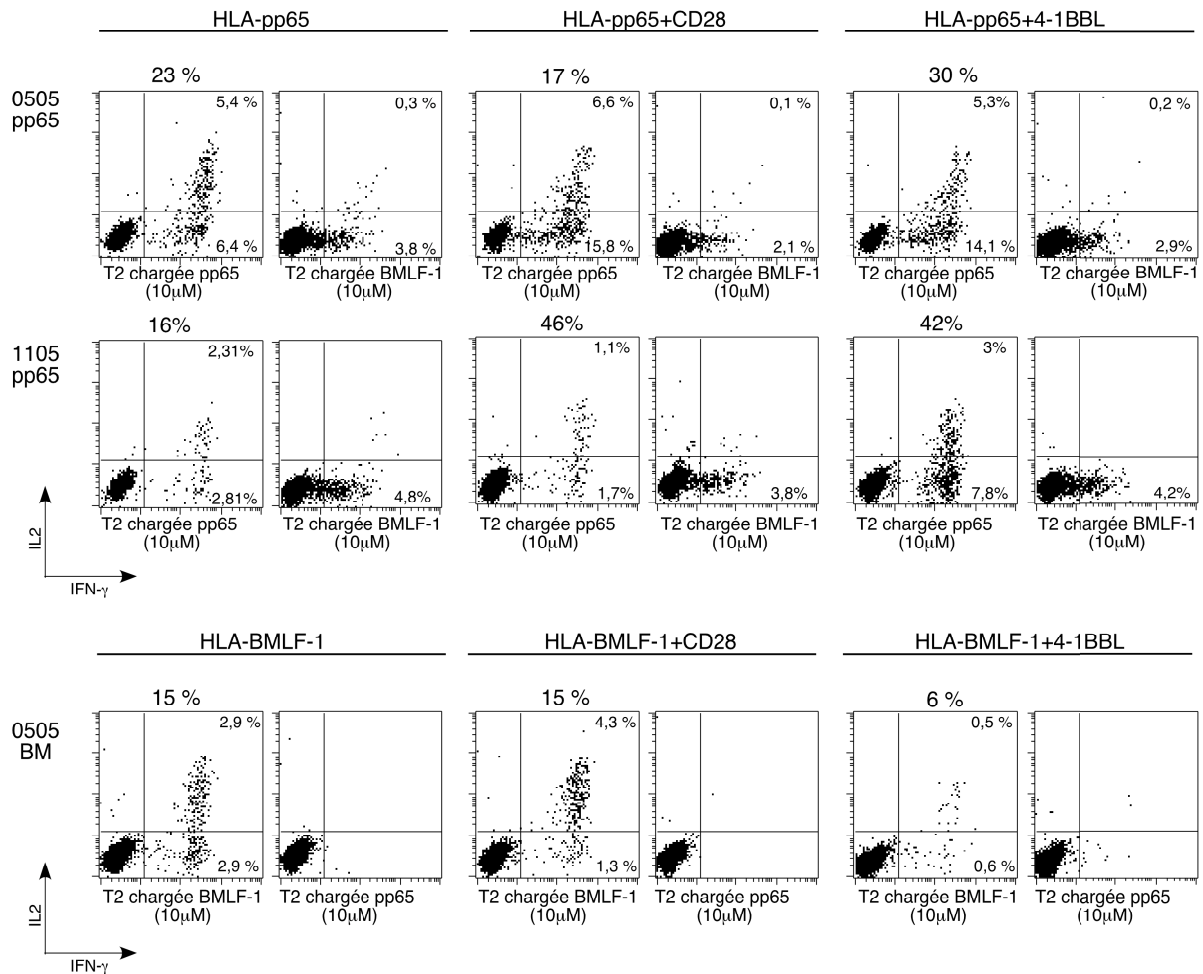


Figure 30. Sécrétion de cytokines IL2 et IFN- γ en réponse à la lignée cellulaire T2 chargée en peptide. Les pourcentages au dessus des « dot plot » correspondent aux pourcentages de lymphocytes spécifiques, et les pourcentages à l'intérieur des cadres correspondent aux pourcentages de cellules positives pour les cytokines.

La re-stimulation spécifique de lymphocytes T mémoires anti-pp65 et anti-BMLF-1 par du HLA-peptide permet donc d'amplifier des populations de cellules qui conservent toutes les caractéristiques de cellules effectrices. Face à des cellules qui présentent l'épitope contre lesquelles elles sont dirigées, elles exercent leur activité cytotoxique et elles sont capables de sécréter de l'IFN- γ et dans une moindre mesure, de l'IL2.

Le contenu intermédiaire en perforine confirme qu'une première re-stimulation *ex vivo* favorise l'émergence d'une sous-population de lymphocytes effecteurs qui ne sont pas en phase terminale de différenciation, reflétant les meilleures capacités prolifératives de ces cellules.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Spécificité du système d'amplification

L'efficacité clinique de l'immunothérapie par transfert de lymphocytes T dépend de la présence de cellules spécifiques d'antigènes parmi les populations injectées. De nombreux systèmes d'amplification des lymphocytes T à usage thérapeutique sont développés : certaines méthodes amplifient l'ensemble des cellules, d'autres n'amplifient que les lymphocytes T spécifiques d'un antigène donné.

Partant du postulat que tous les antigènes reconnus ne sont pas caractérisés, une stratégie consiste à amplifier l'ensemble de la population contenant présumément des cellules d'intérêt. Les méthodes qui utilisent de l'anti-CD3 ou des lectines fournissent un signal d'activation et de prolifération présumément à l'ensemble des cellules. En réalité, il s'avère que ces méthodes aboutissent parfois à la perte des cellules d'intérêt. Ce point a été documenté par Sauce *et al.* qui montrent que la stimulation par de l'anti-CD3 de PBMC aboutit à une perte préférentielle des cellules anti-EBV, qui sont plus sensibles à l'apoptose (Sauce *et al.*, 2002). Une étude dans le contexte tumoral a montré que la reconnaissance de la lignée autologue par des TIL amplifiés par de la PHA (lectine) était maintenue, bien que la fréquence des cellules répondeuses ait été diminuée (Pandolfino *et al.*, 2001). Dans les stratégies d'immunothérapie anti-tumorale, l'injection de lymphocytes T non spécifiques sera inefficace, alors que dans les stratégies anti-virales post-greffe, elle peut être associée à un risque accru de GvH. Ainsi, les stratégies d'enrichissement des populations en effecteurs d'intérêt semblent préférables. Une approche séduisante consiste à trier les populations sur la base de leur réactivité avant de les amplifier, sans préjuger des épitopes antigéniques concernés. Par exemple Rubio *et al.* ont montré qu'il était possible de trier les lymphocytes T qui expriment le CD107a (LAMP-1, *Lysosomal Associated Membrane Protein*) à leur surface (protéine portée par les vésicules intra-cytoplasmiques de granzyme qui devient membranaire au moment du processus de degranulation), en réponse à une stimulation par une lignée tumorale (Rubio *et al.*, 2003). Dans le contexte viral, Gallot *et al.* ont isolé les populations qui exprimaient le CD25 en réponse à une stimulation par la protéine antigénique pp65 entière (Gallot *et al.*, 2001). De fait, la plupart des cellules anti-EBV utilisées dans des protocoles cliniques sont obtenues par re-stimulation des PBMC du donneur sur la lignée B-EBV autologue, alors que l'analyse des réactivités antigéniques n'est en général pas étudiée en profondeur (Haque *et al.*, 1998; Rooney *et al.*, 1998; Bollard *et al.*, 2004). Néanmoins, quelle que soit la méthode d'amplification envisagée, l'identification des spécificités antigéniques contenues dans les populations, même si elle n'est pas obligatoire pour la thérapie, répond à des exigences

rationnelles (Labarriere *et al.*, 1998; Labarriere *et al.*, 2002). De plus, indépendamment de la perte des cellules spécifiques mentionnée plus haut, ces méthodes non spécifiques biaisent le répertoire en amplifiant préférentiellement les lymphocytes T dirigés contre les épitopes immunodominants (c'est à dire ceux qui génèrent la plus forte réponse en terme de pourcentage de cellules activées). Or, des publications chez la souris indiquent que les réponses immunodominantes ne sont pas nécessairement les plus protectrices. En effet, les lymphocytes dirigés contre des épitopes sous-dominants du CMV peuvent également être efficaces pour éliminer l'infection (Pahl-Seibert *et al.*, 2005). Ainsi, une autre démarche consiste à cibler un épitope antigénique donné, et à amplifier uniquement les lymphocytes dirigés contre ce complexe HLA/peptide. C'est cette stratégie que nous avons choisi de développer. Dans ce cas, la question cruciale est de déterminer quel antigène choisir. Jusqu'à présent, dans le contexte anti-tumoral, les antigènes choisis sont d'une part ceux qui sont exprimés par la plus grande proportion d'individus à traiter et d'autre part ceux pour lesquels une fréquence élevée de lymphocytes spécifiques est observée parmi les lymphocytes T infiltrant la tumeur. L'avantage de cette stratégie est qu'elle permettra en outre d'amplifier spécifiquement les lymphocytes dont on aura au préalable déterminé l'intérêt protecteur. Des éléments suggèrent que les lymphocytes anti-Melan-A/MART-1 ou anti-gp100 présentent un intérêt clinique car injectés sous forme de clones ils induisent des régressions de métastases (Yee *et al.*, 2002). De plus, ils sont retrouvés préférentiellement parmi les TIL injectés à des patients qui répondent au traitement, (Labarrière *et al.*, données non publiées). Dans le contexte anti-viral, l'étude récente de Cobbold *et al.* chez l'homme apporte des premières indications sur le fait que l'injection de lymphocytes T spécifiques des épitopes des antigènes pp65 et IE1 semble protéger contre la survenue de la maladie à CMV chez des patients ayant reçu des greffes de moelle (Cobbold *et al.*, 2005). Une des limites aux stratégies ne s'adressant qu'à un seul épitope est de voir la tumeur perdre l'expression de l'antigène ciblé ou le virus muter, échappant ainsi à la destruction. Cet aspect a été documenté dans le contexte tumoral suite à un protocole de vaccination peptidique (Lee *et al.*, 1998) et dans le contexte anti-viral après injection de clones T anti-VIH (Koenig *et al.*, 1995). Le recours aux stratégies multi-épitopiques par injection de lymphocytes T ciblant plusieurs spécificités antigéniques différentes pourrait alors limiter ce risque.

La spécificité d'une méthode d'amplification est conférée par l'utilisation des complexes HLA-peptide qui fournissent le signal 1 d'activation. La faible affinité des complexes HLA-peptide pour le TCR nécessite leur immobilisation (Corr *et al.*, 1994). Pour cela, nous

utilisons des complexes HLA-peptide portant un tag biotine, mais d'autres équipes ont choisi d'utiliser des complexes chimériques HLA-Ig (Oelke *et al.*, 2003).

Dans notre modèle, nous avons choisi d'adjoindre un signal 2 de co-stimulation par le CD28 et le 4-1BB. Pour stimuler le CD28, nous avons utilisé de l'anticorps anti-CD28, puisque la présence du récepteur inhibiteur CTLA-4, exclut la possibilité d'utiliser les ligands B7.1 ou B7.2. Pour stimuler le 4-1BB, nous avons utilisé le ligand recombinant, qui fournit présumément un signal plus physiologique que des anticorps agonistes. Dans une première étude, nous avons montré que le 4-1BBL devait être immobilisé ou multimérisé pour être actif.

Immobilisation des ligands

Pour immobiliser les ligands, deux grandes stratégies sont développées : ils peuvent être enchâssés dans une membrane (cellulaire (Latouche *et al.*, 2000) ou artificielle – liposome (Prakken *et al.*, 2000)) ou immobilisés sur des supports inertes (billes). La fluidité des membranes autorise un mouvement relatif des protéines, ce qui peut représenter un certain intérêt en permettant l'organisation physiologique des ligands en SMAC (*SupraMolecular Activation Cluster*), observée au cours de la formation de la synapse immunologique (Giannoni *et al.*, 2005). Ce point peut représenter un avantage non négligeable au cours de l'activation primaire des lymphocytes T naïfs, mais les récepteurs d'activation étant déjà organisés à la surface des lymphocytes T mémoires (Watson *et al.*, 2004) il est vraisemblable qu'il ne soit pas crucial dans ce cadre. L'utilisation de lignées transfectées avec les ligands d'activation permet de ne pas se heurter aux techniques empiriques de renaturation des protéines recombinantes, qui peuvent être longues à aboutir. Néanmoins, elle impose d'établir des lignées stables pour chaque nouveau ligand que l'on veut utiliser, ce qui peut être long et fastidieux, en particulier si l'on souhaite s'intéresser à différents complexes CMH-peptide. En cela, la stratégie adoptée par Maus *et al.* qui a consisté à transfecter une lignée par le CD32 (récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines) est intéressante, puisqu'elle permet « d'habiller » la lignée présentatrice à façon (Maus *et al.*, 2002). Nous avons choisi d'immobiliser nos supports sur des billes magnétiques, qui présentent l'avantage d'être simples d'utilisation. Elles fournissent les signaux d'activation de manière reproductible et nous avons montré que la calibration de ces billes permet ensuite de choisir avec précision la stoechiométrie signal1/signal2 désirée. Elles sont isolables sur un aimant, de part leur caractère magnétique. Ainsi, il est possible de les enlever des cultures à n'importe quel

moment, permettant par exemple de limiter la durée de la stimulation antigénique. Ce support d'immobilisation est également utilisé par d'autres équipes (Oelke *et al.*, 2003), mais il en existe d'autres, comme les billes en latex (Tham *et al.*, 2001). Les protéines peuvent également être immobilisées sur certaines surfaces en plastique par adsorption. Cette technique ne permet pas d'orienter les ligands et est difficile à appliquer pour des cultures en grands volume, ce qui limite son intérêt pour amplifier des cellules à usage clinique.

Modèle de l'étude

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'amplification des lymphocytes T spécifiques de deux épitopes viraux différents : un épitope (NLVPMVATV₄₉₅₋₅₀₃) de la protéine pp65 du virus CMV et un épitope (GLCTLVAML₂₅₉₋₂₆₇) de la protéine BMLF-1, qui sont présentés par le HLA A*0201. Nous sommes partis de PBMC d'individus séropositifs ; notre méthode de stimulation s'est donc adressée à des populations mémoires. De plus, les infections par ces deux virus sont chroniques et des réactivations virales se produisent de manière récurrente. Ainsi les répertoires auxquels nous nous intéressons sont constitués de cellules qui vraisemblablement *in vivo* ont été réactivées plusieurs fois.

Nous avons analysé les populations spécifiques obtenues au bout de 14 jours de culture après une seule stimulation. En partant de lymphocytes T CD8, les pourcentages d'amplification, bien que variables selon les donneurs, sont élevés. Néanmoins, nous avons analysé le nombre absolu de cellules spécifiques obtenues, parce que c'est ce paramètre, plus que l'amplification relative des cellules spécifiques par rapport aux non spécifiques qui nous semble important.

Le premier élément de surprise a été les fortes amplifications que nous avons obtenues en présence du seul signal 1 (HLA). Il est difficile de comparer nos résultats à ceux obtenus d'autres ayant utilisés des stimulations acellulaires avec ou sans 4-1BBL, car dans ces autres études les cellules sont analysées au bout de plusieurs séries de stimulation (Maus *et al.*, 2002; Oelke *et al.*, 2003). Nous montrons d'ailleurs ici, qu'il n'est pas nécessaire, dans les contextes antigéniques considérés, de restimuler les cellules plusieurs fois pour les amplifier fortement. Il est séduisant de laisser l'activation se dérouler en manipulant les cellules le moins possible et les restimulations à des fréquences rapprochées, en présence d'IL2, risquent d'induire des phénomènes d'AICD (Radvanyi *et al.*, 1993; Wesselborg *et al.*, 1993). Nous envisageons cependant d'évaluer prochainement si une seconde stimulation de nos cellules, au bout de deux à trois semaines après la première, augmente encore le nombre de cellules spécifiques obtenues. Parallèlement, il serait informatif d'effectuer des mesures à des fréquences plus

rapprochées (tous les jours ou tous les deux jours après une première stimulation) pour observer la cinétique de prolifération des cellules dans les différentes conditions de stimulations, comme cela est effectué dans les études similaires (Maus *et al.*, 2002; Oelke *et al.*, 2003; Sauce *et al.*, 2003; Bukczynski *et al.*, 2004).

Dans des expériences préliminaires, nous avons stimulé des PBMC totaux. Nous avons choisi de ne pas poursuivre dans cette direction, puisque dans un premier temps et pour différentes raisons nous avons intérêt à travailler à partir de population CD8 purifiées (reproductibilité, effet du 4-1BBL uniquement sur ces cellules, enrichissement en cellules spécifiques). Néanmoins, bien que les analyses aient été menées de manière moins approfondies que pour les CD8 purifiés, ces conditions nous ont permis d'obtenir de fortes amplifications. Les cellules spécifiques ont parfois représenté jusqu'à 70% des cellules totales en présence de 4-1BBL, alors que nous n'avons jamais atteint de telles fréquences à partir de T CD8. Ces résultats suggèrent que des populations auxiliaires participent à l'amplification des lymphocytes T CD8. Ainsi, un de nos projets futurs vise à identifier ces populations en réalisant des co-cultures. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux cellules NK. En effet, il a été documenté chez la souris que le 4-1BB augmentait la production d'IFN- γ par les cellules NK (Pan *et al.*, 2004), et que ces cellules étaient indispensables à l'effet anti-tumoral observé *in vivo* par injection d'anti-4-1BB (Wilcox *et al.*, 2002).

Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules amplifiées

– phénotype

Au cours des restimulations antigéniques successives, le CD28 est fréquemment perdu. Ainsi, *in vitro*, les clones et les lignées polyclonales T sont CD28- (Linsley *et al.*, 1993). De même, *in vivo*, certains lymphocytes T mémoires, et en particulier les lymphocytes T spécifiques de pp65 sont majoritairement CD28-.

Nous avons montré que l'ensemble des lymphocytes T anti-pp65 exprime davantage le CD28 après amplification et que les cellules anti-BMLF-1 maintiennent leur expression de CD28. Ceci démontre tout d'abord que notre mode de stimulation n'entraîne pas la perte d'expression de ce marqueur. Nous avons également noté que les cellules anti-pp65 et anti-BMLF-1 amplifiées expriment moins de CD45RA par rapport à ce qui est décrit dans la littérature (Hislop *et al.*, 2001; Appay *et al.*, 2002a). Ces résultats suggèrent donc fortement que les cellules mémoires CD28+, qui sont également CD45RA-, ont proliféré davantage que les cellules CD28-/CD45RA+. Pour démontrer formellement l'avantage prolifératif des

cellules CD28+/CD45RA- il faudrait amplifier séparément les sous-populations lymphocytaires, éventuellement en présence de CFSE. Bien qu'elle reste non prouvée formellement, cette hypothèse serait en accord avec les résultats de la littérature. Appay *et al.* en stimulant par de l'anti-CD3 des populations triées sur la base de l'expression du CD27 et du CD28 ont montré que les fractions CD28-/CD27+ et CD28-/CD27- ne se divisaient pas, en comparaison aux cellules CD28+/CD27+ qui subissaient plusieurs cycles de division (Appay *et al.*, 2002a). Hamann *et al.* ont également montré que les cellules CD45RA-/CD27+ prolifèrent plus que les CD45RA+/CD27- (Hamann *et al.*, 1997). Des arguments cliniques indiquent également les meilleures capacités prolifératives des cellules CD28+ spécifiques d'antigènes tumoraux. L'analyse du devenir des lymphocytes T anti-Melan-A/MART-1 injectés à des patients a permis à Powell *et al.* de montrer que les cellules CD28+, qui étaient minoritaires dans la population de départ, ont rapidement représenté la population majoritaire *in vivo* (Powell *et al.*, 2005). Ochsenbein *et al.* ont montré que les lymphocytes T anti-VIH CD27+ survivaient mieux *in vivo* que les lymphocytes CD27- (Ochsenbein *et al.*, 2004). Les meilleures capacités prolifératives des cellules mémoires CD28+/CD27+ par rapport aux cellules CD28-/CD27- contribue à la définition d'un modèle de différenciation des lymphocytes T proposant que les cellules CD28-/CD27- soient des effecteurs plus différenciés. Le stade ultime de différenciation est caractérisé par la ré-expression du marqueur CD45RA. Néanmoins, à l'heure actuelle, il n'y a pas de données permettant d'expliquer pourquoi certains lymphocytes mémoires atteignent préférentiellement ce stade de différenciation.

Par notre mode d'amplification, il semble cependant que dans un certain nombre de cas, nous obtenions un plus grand nombre de lymphocytes T anti-pp65 que de lymphocytes T anti-BMLF-1. Ces résultats seraient en accord avec ceux de Sauce *et al.*, qui montrent qu'avec leur condition de stimulation par de l'anti-CD3 en présence de fortes doses d'IL2, les lymphocytes anti-BMLF-1 sont plus sensibles à l'AICD que les lymphocytes T anti-pp65. De plus, les auteurs montrent que les cellules CD27- (contenant les cellules anti-pp65) prolifèrent légèrement plus que les CD27+ (contenant les cellules anti-BMLF-1) (Sauce *et al.*, 2003).

Nous arrivons donc au paradoxe suivant : les cellules mémoires CD28- prolifèrent moins bien que les cellules mémoires CD28+. Cependant, bien que les cellules anti-pp65 soient majoritairement CD28- avant stimulation, nos conditions d'amplification permettent d'en obtenir plus (dont une plus grande proportion exprime le CD28) que les cellules BMLF-1, qui elles sont majoritairement CD28+ (et le sont restées après stimulation). Ce constat suggère

que d'autres paramètres que ceux que nous avons étudiés influencent la prolifération des cellules *in vitro*. Pour apporter des éclaircissements sur ce point, il conviendrait d'étudier de manière plus approfondie le phénotype des cellules spécifiques avant et après amplification en réalisant des marquages multi-couleurs (CD28/CD27/CD45RA par exemple). De plus, il serait informatif d'analyser en parallèle la sensibilité à l'apoptose des différentes sous-populations.

– Capacité fonctionnelle

Nous avons montré que nos cellules ont des caractéristiques fonctionnelles de cellules effectrices : elles sont capables de lyser une cible présentant l'antigène et elles contiennent des vésicules de perforine pré-formées. Les cellules générées sont également capables de produire de l'IFN- γ et dans une certaine mesure, de l'IL2. Les cytokines ne sont produites que par une partie des cellules spécifiques. Comme les populations amplifiées ne sont pas homogènes, il est envisagé dans des expériences prochaines de déterminer si les cytokines sont produites préférentiellement par une sous-population particulière. Hamann *et al.* ont montré que les cellules mémoires CD45RA⁺ (CD27⁻) ne produisent pas d'IL2, contrairement aux cellules CD45RA⁻ (Hamann *et al.*, 1997). Une étude récente a montré que la production d'IL2 par les cellules anti-pp65 en réponse à une stimulation spécifique est confinée à la population CD28⁺. L'expression forcée du CD28 dans des PBMC CD28⁻ (par transfection) permet de rétablir la capacité de ces cellules à sécréter de l'IL2 (Topp *et al.*, 2003). Or, les clones T anti-Melan-A/MART-1 dont nous disposons qui sont sélectionnés pour leur capacité à produire de l'IL2 (Vignard *et al.*, 2005) sont CD28⁻ et CD45RA⁻. Il serait donc intéressant de caractériser phénotypiquement les cellules qui produisent de l'IL2 dans notre système, bien que le statut CD28 ne soit vraisemblablement pas discriminant.

Effet de la co-stimulation

Les différences phénotypiques entre les lymphocytes T anti-pp65 et anti-BMLF-1 suggèrent que ces cellules ne sont pas dans le même état de différenciation, et qu'elles ont donc vraisemblablement des besoins en signaux de co-stimulation différents.

Nous avons émis l'hypothèse que la co-stimulation 4-1BB prenait le relais de la co-stimulation CD28, lorsque au cours des stimulations antigéniques successives, celui-ci est perdu. Pour cela, l'antigène pp65 constitue un bon modèle d'étude. De fait, nous avons montré que la co-stimulation 4-1BB permet d'augmenter le nombre absolu de cellules

spécifiques de pp65 chez la plupart des individus, alors que la co-stimulation CD28 est inefficace. En revanche, nous avons montré que la co-stimulation par le 4-1BB ne favorisait pas l'émergence d'une population CD28⁻ en culture. De même, entre nos mains, la co-stimulation par le 4-1BB ne semble pas induire l'émergence d'une population CD27⁻, comme le suggère l'étude de Bukczynski *et al.* (Bukczynski *et al.*, 2004).

Nous avons également montré qu'au cours des stimulations primaires des lymphocytes T par de l'anti-CD3, la co-stimulation par le CD28 est plus efficace que la co-stimulation par le 4-1BB pour faire proliférer les cellules. Nous avons donc voulu comparer ces deux voies dans un contexte de restimulation de cellules mémoires. Pour cela, nous avons étudié les lymphocytes T anti-BMLF-1, qui sont majoritairement CD28⁺. Nous avons montré qu'à l'issue de la stimulation, trois groupes également représentés se distinguent : un pour lequel la co-stimulation CD28 est plus efficace, un pour lequel la co-stimulation 4-1BB est plus efficace, et un pour lequel les deux co-stimuli sont aussi efficaces l'un que l'autre. Nous n'avons pas déterminé de facteurs permettant d'expliquer ces différences, en particulier, nous avons montré qu'il n'y a pas de corrélation avec le statut CD28 avant l'amplification. Néanmoins, sur certains lymphocytes CD28⁺, le 4-1BBL est plus efficace que l'anti-CD28, confirmant la contribution accrue de la co-stimulation 4-1BB au cours des restimulations antigéniques successives (Bertram *et al.*, 2004a). Ces résultats nous incitent donc à tester des combinaisons de signaux de co-stimulation : par exemple, un système attractif consisterait à délivrer d'abord un signal CD28, puis quelques jours plus tard, une fois que l'expression du 4-1BB est maximale, à fournir un signal 4-1BBL.

Néanmoins, dans aucun des deux contextes antigéniques, nous n'avons pu montré statistiquement le bénéfice de l'utilisation de signaux de co-stimulation. Ceci tient au fait que la variabilité inter-individuelle est grande, mais également au fait que le signal HLA seul est très efficace.

Nous avons donc montré que l'impact de ces deux voies de co-stimulation est différent selon l'antigène considéré. Concernant un épitope du virus de la grippe (influenza) qui entraîne une infection aiguë, Bukczynski *et al.* ont montré que les co-stimuli CD28 ou 4-1BB associé à un signal 1 spécifique sont également efficaces pour amplifier des lymphocytes T (Bukczynski *et al.*, 2004). Sauce *et al.* ont montré qu'au cours d'une stimulation polyclonale par de l'anti-CD3, un co-signal délivré par de l'anti-CD28 favorisait la prolifération des lymphocytes T anti-BMLF-1 en diminuant leur sensibilité particulière à l'AICD (Sauce *et al.*, 2002).

Cytokines utilisées

Dans notre modèle, nous avons montré que les lymphocytes spécifiques ont besoin de cytokines exogènes pour proliférer. Au début de l'activation, nous avons ajouté de l'IL15, car nous avons montré que cette cytokine favorise l'expression du 4-1BB par les lymphocytes T CD8 purifiés stimulés. Néanmoins, l'IL2 que nous ajoutons après trois jours de culture semble un facteur indispensable pour la prolifération spécifique. Quand les cellules sont cultivées pendant les 14 jours en présence d'IL15, bien que l'ensemble des cellules prolifère intensément, l'amplification spécifique est moins efficace (non présenté). Cependant, il est clairement établi que l'IL2 a un rôle pro-apoptotique favorisant l'AICD durant la phase de contraction (Lenardo, 1996). De fait, nous avons constaté qu'au bout de 19-21 jours, le pourcentage de cellule spécifique diminue (non présenté). Ainsi, nous envisageons d'étudier si la substitution progressive de l'IL2 par de l'IL7 au cours des 14 jours pourrait favoriser la survie à plus long terme des cellules spécifiques.

Amplification des lymphocytes T anti-tumoraux

Aucune étude n'a établi de corrélation entre l'efficacité clinique de l'injection des cellules et leur phénotype. Dans les années à venir, les résultats des protocoles en cours devraient permettre d'apporter des connaissances sur cet aspect, ce qui justifie de s'intéresser dès maintenant à l'impact des conditions de stimulation *ex vivo* sur les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules générées. Cependant, le phénotype de lymphocytes T anti-tumoraux circulants *in vivo* est beaucoup moins bien connu que le phénotype des lymphocytes T anti-viraux principalement parce que les études sont rendues difficiles par la faible fréquence de ces cellules.

Dans le contexte anti-tumoral, nous envisageons d'utiliser notre mode de stimulation pour deux applications principales.

Tout d'abord, nous voulons mettre à profit notre système pour amplifier, à partir de sang périphérique de patients porteurs de mélanome, des lymphocytes anti-tumoraux dont la fréquence est faible dans le sang des patients et dont l'amplification est difficile par les méthodes classiques. Les épitopes choisis pour cette étude sont NA-17A, NY-ESO ou gp100.

Nous envisageons également de travailler dans le contexte antigénique Melan-A/MART-1. Les lymphocytes T dirigés contre cet épitope sont faciles à obtenir par les méthodes classiques (sensibilisation dendritiques, tri par des complexes HLA-peptide). Néanmoins, les

méthodes actuelles de restimulation de ces cellules aboutissent systématiquement à l'obtention de clones ou de populations polyclonales CD28-. Dans une expérience préliminaire, nous avons montré qu'une seule stimulation de 14 jours avec des billes HLA permet d'amplifier ces cellules, et que suite à cette stimulation, elles conservent l'expression du CD28 et du CD27. De plus, une proportion non négligeable des cellules spécifiques (60%) expriment le marqueur de migration ganglionnaire CD62L. Une large proportion d'entre-elles sécrète de l'IFN- γ et exprime en surface le marqueur CD107a (fig. 1).

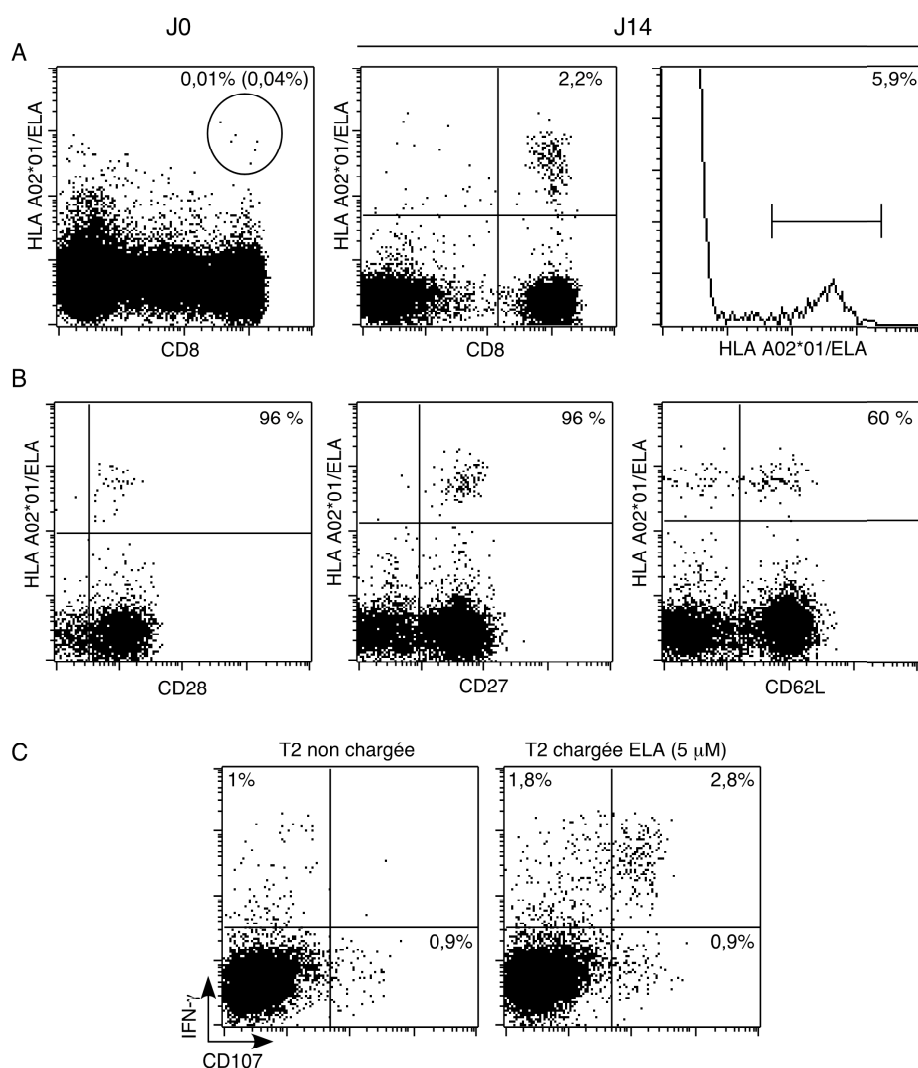


Figure 1. Amplification des lymphocytes T anti-Melan-A/MART-1 à partir des PBMC d'un patient. A. Analyse par marquage tétramère HLA/CD8 avant et après stimulation. B. Analyse phénotypique des marqueurs CD27, CD28 et CD62L sur les cellules amplifiées. Les pourcentages en haut à droite indiquent la fréquence des lymphocytes positifs parmi les cellules spécifiques. C. Analyse fonctionnelle des cellules obtenues : sécrétion d'IFN- γ et marquage CD107a de surface en réponse à la T2 chargé en peptide. Les pourcentages dans chaque quadrant indiquent ici la fréquence des cellules détectées parmi la population totale.

Les lymphocytes T idéaux à injecter dans des protocoles d'immunothérapie devraient en premier lieu être capables de migrer vers la tumeur, et d'exercer une activité lytique. Les cellules injectées à l'heure actuelle sont cytotoxiques et sécrètent des cytokines (Vignard *et al.*, 2005). Leur capacité de migration en périphérie est en général évaluée par la mesure de l'expression des marqueurs de migration vers les ganglions comme CCR7 et CD62L. Toutefois, il est documenté que l'expression de la molécule CLA est associée à une migration préférentielle des lymphocytes T vers la peau (Le Gal *et al.*, 2001), ce qui en ferait un bon marqueur à utiliser dans les protocoles d'immunothérapie du mélanome. Le potentiel prolifératif *in vivo* est également un aspect à prendre en considération. L'étude de Powell *et al.*, qui nécessite d'être confirmée par d'autres équipes, constitue une première indication sur le fait que les lymphocytes anti-Melan-A/MART-1 CD28+ ont un avantage de survie ou de prolifération *in vivo* par rapport aux lymphocytes de même spécificité CD28-.

De même, les cellules injectées idéales devraient être capables de survivre à long terme. Très récemment, van Leeuwen *et al.* ont montré que la ré-expression de l'IL7R α caractérise une sous-population de cellules mémoires à long terme. Cette ré-expression semble corrélée avec l'expression du CD8 α/α et avec le CD27 (Madakamutil *et al.*, 2004; van Leeuwen *et al.*, 2005). Les lymphocytes T anti-CMV et anti-EBV ne ré-expriment que très faiblement l'IL7R α *in vivo*, vraisemblablement du fait de la persistance de l'antigène dans l'organisme (Lang *et al.*, 2005). Il serait donc intéressant d'utiliser l'IL7R α et le CD8 α/α en tant que nouveaux marqueurs afin de déterminer si les lymphocytes T anti-tumoraux expriment ces marqueurs *in vivo* et si l'amplification *ex vivo* des cellules par différents cocktails de molécules de co-stimulation et de cytokines maintient ou induit l'expression de ces marqueurs.

Ainsi, le système d'amplification acellulaire de lymphocyte T idéal permettrait d'expandre spécifiquement les lymphocytes T d'intérêt à l'aide d'une combinaison de molécules de co-stimulation et de cytokines qui seraient choisies pour leur rôle sur l'activation et la différenciation T en fonction des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des effecteurs souhaitées.

MATERIEL ET METHODES

I. ETUDE DE L'EXPRESSION DU 4-1BB

1. Donneurs et purification lymphocytaire

Les donneurs sont des volontaires sains. Pour isoler les lymphocytes T purifiés, le cocktail d'anticorps « Rosette Sep » (Stem Cell Technology) est ajouté sur le sang total (50 µl/ml de sang). Le sang est dilué au 1/3 dans du RPMI 1640 (Sigma) et le mélange est déposé sur un coussin de Ficoll (Eurobio). L'ensemble est centrifugé et les PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) sont récupérés à l'anneau formé entre le Ficoll et le sérum. Ils sont ensuite lavés 3 fois et numérés sur cellule de Malassez. Pour isoler des lymphocytes T CD8, le tri positif (Miltenyi) est réalisé sur des PBMC.

2. Stimulation polyclonale des lymphocytes

L'anti-CD3 est immobilisé au plastique (1µg/ml) dans des plaques 24 puits (Nunc, 1ml/puit, incubation ON à 4°C). Quand mentionné, l'anti-CD28 (clone CD28.2, Immunotech) est co-incubé avec l'anti-CD3 dans les mêmes conditions. Les plaques sont ensuite lavées 3 fois par du PBS pour éliminer l'anticorps non fixé. Les cellules sontensemencées à 0,8 M/ml en RPMI 1640 supplémenté par 8% de sérum humain, 2mM de glutamine, 1% de pénicilline/streptomycine.

Quand mentionné, l'IL15 est ajouté à 20ng/ml et l'IL12 à 2ng/ml. La stimulation est menée pendant 72h.

3. Marquage cellulaire par cytométrie de flux

Au bout de 72h, les cellules sont lavées et 100 000 cellules sont incubées dans 30 µl de PBS-0,1%BSA avec une concentration saturante d'anticorps couplé à un fluorochrome pendant 30 mn à 4°C (liste des anticorps utilisés, tableau I). Les cellules sont ensuite lavées 3 fois dans du PBS-0,1%BSA avant d'être analysées par cytométrie de flux (Facs scan ou LSR, BD Biosciences). L'analyse informatique est réalisée avec le logiciel CellQuest Pro (BD Biosciences).

II. AMPLIFICATION DES LYMPHOCYTES T SPECIFIQUES

1. Amplification des lymphocytes

a. Lymphocytes

Les PBMC ont été obtenus à partir de sang périphérique total prélevé chez des individus volontaires sains par l'intermédiaire de l'Etablissement français du Sang de Nantes. Sur une partie de ces PBMC, un tri positif (Miltenyi) a été effectué pour isoler les lymphocytes T CD8. Les échantillons ont été conservés congelés en SVF-10% DMSO par ampoule de 10.10^6 cellules avant utilisation.

Les analyses sérologiques ont été effectuées par recherche d'Ig spécifiques sur un échantillon de sérum au laboratoire de Virologie du CHU de Nantes.

b. Protéines recombinantes

Les complexes HLA A*0201-peptide ont été produits par Klara Echasserieau sur la plateforme de Protéines Recombinantes de Nantes (INSERM U601) selon un protocole préalablement décrit (Bodinier *et al.*, 2000). Les peptides issus des protéines pp65 (aa 495-503 NLVPMVATV) et BMLF-1 (aa 259-267 GLCTLVAML) ont été synthétisés chez Genosys. Les monomères biotinylés sont tétramérisés avec de la streptavidine couplée PE (BD) à un ratio 4/0,8 pendant 1h à température ambiante.

c. Billes

Les billes permettant l'immobilisation des signaux activateurs sont des billes M280 couplées de façon covalente à la streptavidine (Dyna).

L'immobilisation des ligands biotinylés sur ces billes préalablement lavées a lieu pendant une heure à température ambiante.

La détermination des quantités saturantes de protéines à utiliser s'effectue en incubant un nombre fixe de billes (67.10^3) avec une gamme de concentration de ligands biotinylés. Les billes sont ensuite marquées avec des anticorps de cytométrie et analysées au FACS. L'anti-CD28 est révélé par un anticorps anti-souris couplé FITC. Les complexes HLA-peptide sont

révélés par un anticorps anti-classe I couplé FITC et le 4-1BBL est révélé par un anticorps anti-4-1BBL couplé PE.

Pour amplifier les lymphocytes $1,2 \cdot 10^6$ billes sont préparées et lavées pour éliminer les ligands non fixés. Elles sont incubées avec $0,8 \cdot 10^6$ cellules totales (ratio billes/cellules : 1,5/1).

d. Cytokines

A J0, l'IL15 (Abcys) est ajoutée à 20 ng/ml. A J3, 50UI/ml d'IL2 sont ajoutées. Par la suite, pour l'entretien des cultures du milieu supplémenté en IL2 (50UI/ml) est utilisé.

2. Evaluation de l'amplification lymphocytaire

a. Analyse phénotypique

A J14, le volume des culture est mesuré, les lymphocytes sont numérés et les billes sont retirées. 10^5 cellules sont prélevées et lavées analysées par cytométrie de flux à l'aide de tétramère HLA-peptide (10µg/ml) et de différents anticorps (liste en tableau I). Les cellules sont incubées 45min à 4°C avec l'anticorps ou le tétramère d'intérêt dilué en PBS-0,1%BSA. L'acquisition a été effectuée sur un cytomètre LSR (BD Biosciences) et l'analyse a été menée avec le logiciel CellQuest Pro pour Mac OSX (BD Biosciences).

b. Analyse fonctionnelle

- Détection de cytokines

La capacité des lymphocytes à sécréter les cytokines IFN-γ et IL2 a été évaluée par marquage intra-cytoplasmique suite à une stimulation de 6 h par la lignée T2 chargée en peptide (10mM) en présence de bréfeldine A (Sigma). A l'issue de la stimulation, les cellules sont fixées (par une solution à 10% de paraformaldéhyde pendant 10 min à température ambiante) et perméabilisée par une solution à 0,1% de saponine (Sigma). Les cellules sont ensuite incubées avec 30µl d'une solution saturante d'anticorps dilué en PBS-0,1% BSA-0,1%saponine.

- Cytotoxicité

Les lymphocytes T sont co-cultivés avec les cellules cibles marquées au ^{51}Cr et chargées en peptide (10 μM) à différents rapports effecteurs/cibles (30/1, 10/1, 1/1) pendant 4 h. La cytotoxicité des lymphocytes T est évaluée par un test standard de relargage du chrome 51. L'évaluation du pourcentage de lyse est calculée par la formule suivante :

$$\% \text{ lyse} = \frac{\text{cpm spécifique-SR}}{\text{MR-SR}} \times 100$$

Où SR= spontaneous release, activité libérée par les T2 seules, et MR=maximum release, activité libérée par les T2 éclatées par du Triton X100 (solution à 5%).

Molécule ciblée	Clone et isotype	fluorochrome
4-1BB	4B4 IgG1, κ	PE
CD3	HIT3a IgG2a, κ	FITC
CD4	RPA-T4 IgG1, κ	FITC
CD8	RPA-T8 IgG1, κ	FITC ou APC
CD28	CD28.2 IgG1, κ	FITC ou APC
CD27	M-T 271 IgG1, κ	FITC
CCR7	2H4 IgM, κ	FITC
CD62L	Dreg56 IgG1, κ	CyChrome
CD45RA	HI100 IgG2b, κ	FITC
CD45RO	UCHL1 IgG2a, κ	FITC
perforine	δG9 , IgG2b	FITC
IFN- γ	45.B3 IgG1	FITC
IL2	MQ1-17H12 IgG2a, κ	PE

Tableau I. Liste des anticorps utilisés

Tous les anticorps marqués proviennent de chez BD Biosciences

PE : phycoerythrine

FITC : fluoréscéine

APC : allophycocyanine

III. ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses statistiques ont été menées comme ceci : dans un premier temps, une analyse de variance (ANOVA) est réalisée. Si la différence entre l'ensemble des groupes étudiés est significative ($p < 0,05$), un post-test est effectué. Différents post-tests ont été utilisés : pour comparer tous les groupes entre eux, c'est un test de Tukey qui s'applique, pour comparer un groupe avec tous les autres, c'est un test de Dunnett, et pour comparer des groupes particuliers entre eux, c'est un test de Bonferroni. Les analyses ont été effectuées par le logiciel InStat 2.01.

BIBLIOGRAPHIE

- Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., and Honjo, T.** (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 8, 765-72.
- al-Ramadi, B. K., Jelonek, M. T., Boyd, L. F., Margulies, D. H., and Bothwell, A. L.** (1995). Lack of strict correlation of functional sensitization with the apparent affinity of MHC/peptide complexes for the TCR. *J Immunol* 155, 662-73.
- Alderson, M. R., Smith, C. A., Tough, T. W., Davis-Smith, T., Armitage, R. J., Falk, B., Roux, E., Baker, E., Sutherland, G. R., and Din, W. S.** (1994). Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand. *Eur J Immunol* 24, 2219-27.
- Alderson, M. R., Tough, T. W., Davis-Smith, T., Braddy, S., Falk, B., Schooley, K. A., Goodwin, R. G., Smith, C. A., Ramsdell, F., and Lynch, D. H.** (1995). Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med* 181, 71-7.
- Alpdogan, O., Eng, J. M., Muriglan, S. J., Willis, L. M., Hubbard, V. M., Tjoe, K. H., Terwey, T. H., Kochman, A., and van den Brink, M. R.** (2005). Interleukin-15 enhances immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 105, 865-73.
- Altman, J. D., Moss, P. A., Goulder, P. J., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J., and Davis, M. M.** (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94-6.
- Alves, N. L., Arosa, F. A., and van Lier, R. A.** (2005). IL-21 sustains CD28 expression on IL-15-activated human naive CD8⁺ T cells. *J Immunol* 175, 755-62.
- Alves, N. L., Hooibrink, B., Arosa, F. A., and van Lier, R. A.** (2003). IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naive CD8⁺ T cells in vitro. *Blood* 102, 2541-6.
- Anichini, A., Molla, A., Mortarini, R., Tragni, G., Bersani, I., Di Nicola, M., Gianni, A. M., Pilotti, S., Dunbar, R., Cerundolo, V., and Parmiani, G.** (1999). An expanded peripheral T cell population to a cytotoxic T lymphocyte (CTL)-defined, melanocyte-specific antigen in metastatic melanoma patients impacts on generation of peptide-specific CTLs but does not overcome tumor escape from immune surveillance in metastatic lesions. *J Exp Med* 190, 651-67.
- Anichini, A., Scarito, A., Molla, A., Parmiani, G., and Mortarini, R.** (2003). Differentiation of CD8⁺ T cells from tumor-invaded and tumor-free lymph nodes of melanoma patients: role of common gamma-chain cytokines. *J Immunol* 171, 2134-41.
- Appay, V., Dunbar, P. R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G. M., Papagno, L., Ogg, G. S., King, A., Lechner, F., Spina, C. A., *et al.*** (2002a). Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 8, 379-85.
- Appay, V., Zaunders, J. J., Papagno, L., Sutton, J., Jaramillo, A., Waters, A., Easterbrook, P., Grey, P., Smith, D., McMichael, A. J., *et al.*** (2002b). Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *J Immunol* 168, 5954-8.
- Arcaro, A., Gregoire, C., Boucheron, N., Stotz, S., Palmer, E., Malissen, B., and Luescher, I. F.** (2000). Essential role of CD8 palmitoylation in CD8 coreceptor function. *J Immunol* 165, 2068-76.
- Arens, R., Tesselaar, K., Baars, P. A., van Schijndel, G. M., Hendriks, J., Pals, S. T., Krimpenfort, P., Borst, J., van Oers, M. H., and van Lier, R. A.** (2001). Constitutive CD27/CD70 interaction induces expansion of effector-type T cells and results in IFN γ -mediated B cell depletion. *Immunity* 15, 801-12.
- Arstila, T. P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J., and Kourilsky, P.** (1999). A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* 286, 958-61.
- Asao, H., Okuyama, C., Kumaki, S., Ishii, N., Tsuchiya, S., Foster, D., and Sugamura, K.** (2001). Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J Immunol* 167, 1-5.
- Babbitt, B. P., Allen, P. M., Matsueda, G., Haber, E., and Unanue, E. R.** (1985). Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 317, 359-61.
- Bamford, R. N., Battista, A. P., Burton, J. D., Sharma, H., and Waldmann, T. A.** (1996). Interleukin (IL) 15/IL-T production by the adult T-cell leukemia cell line HuT-102 is associated with a human T-cell lymphotropic virus type I region /IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuates IL-15 mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2897-902.
- Banchereau, J., and Steinman, R. M.** (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-52.

- Beaty, O., 3rd, Hudson, M. M., Greenwald, C., Luo, X., Fang, L., Wilimas, J. A., Thompson, E. I., Kun, L. E., and Pratt, C. B.** (1995). Subsequent malignancies in children and adolescents after treatment for Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 13, 603-9.
- Becker, T. C., Wherry, E. J., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A., and Ahmed, R.** (2002). Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med* 195, 1541-8.
- Bertram, E. M., Dawicki, W., Sedgmen, B., Bramson, J. L., Lynch, D. H., and Watts, T. H.** (2004a). A switch in costimulation from CD28 to 4-1BB during primary versus secondary CD8 T cell response to influenza in vivo. *J Immunol* 172, 981-8.
- Bertram, E. M., Dawicki, W., and Watts, T. H.** (2004b). Role of T cell costimulation in anti-viral immunity. *Semin Immunol* 16, 185-96.
- Bertram, E. M., Lau, P., and Watts, T. H.** (2002). Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection. *J Immunol* 168, 3777-85.
- Bjorkman, P. J.** (1997). MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions. *Cell* 89, 167-70.
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., and Wiley, D. C.** (1987). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329, 512-8.
- Blaser, B. W., Roychowdhury, S., Kim, D. J., Schwind, N. R., Bhatt, D., Yuan, W., Kusewitt, D. F., Ferketich, A. K., Caligiuri, M. A., and Guimond, M.** (2005). Donor-derived IL-15 is critical for acute allogeneic graft-versus-host disease. *Blood* 105, 894-901.
- Blauvelt, A., Asada, H., Klaus-Kovtun, V., Altman, D. J., Lucey, D. R., and Katz, S. I.** (1996). Interleukin-15 mRNA is expressed by human keratinocytes Langerhans cells, and blood-derived dendritic cells and is downregulated by ultraviolet B radiation. *J Invest Dermatol* 106, 1047-52.
- Bodinier, M., Peyrat, M. A., Tournay, C., Davodeau, F., Romagne, F., Bonneville, M., and Lang, F.** (2000). Efficient detection and immunomagnetic sorting of specific T cells using multimers of MHC class I and peptide with reduced CD8 binding. *Nat Med* 6, 707-10.
- Boise, L. H., Minn, A. J., Noel, P. J., June, C. H., Accavitti, M. A., Lindsten, T., and Thompson, C. B.** (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3, 87-98.
- Bollard, C. M., Aguilar, L., Straathof, K. C., Gahn, B., Huls, M. H., Rousseau, A., Sixbey, J., Gresik, M. V., Carrum, G., Hudson, M., *et al.*** (2004). Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus+ Hodgkin's disease. *J Exp Med* 200, 1623-33.
- Bonini, C., Ferrari, G., Verzeletti, S., Servida, P., Zappone, E., Ruggieri, L., Ponzoni, M., Rossini, S., Mavilio, F., Traversari, C., and Bordignon, C.** (1997). HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 276, 1719-24.
- Boon, T., and van der Bruggen, P.** (1996). Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med* 183, 725-9.
- Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B. H., Shaw, G. M., and Oldstone, M. B.** (1994). Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 68, 6103-10.
- Bosque, A., Pardo, J., Martinez-Lorenzo, M. J., Lasier, P., Larrad, L., Marzo, I., Naval, J., and Anel, A.** (2005). Human CD8+ T cell blasts are more sensitive than CD4+ T cell blasts to regulation by APO2L/TRAIL. *Eur J Immunol* 35, 1812-21.
- Bowman, M. R., Crimmins, M. A., Yetz-Aldape, J., Kriz, R., Kelleher, K., and Herrmann, S.** (1994). The cloning of CD70 and its identification as the ligand for CD27. *J Immunol* 152, 1756-61.
- Bradley, L. M., Haynes, L., and Swain, S. L.** (2005). IL-7: maintaining T-cell memory and achieving homeostasis. *Trends Immunol* 26, 172-6.
- Brandt, K., Bulfone-Paus, S., Foster, D. C., and Ruckert, R.** (2003). Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation. *Blood* 102, 4090-8.
- Brehm, M. A., Pinto, A. K., Daniels, K. A., Schneck, J. P., Welsh, R. M., and Selin, L. K.** (2002). T cell immunodominance and maintenance of memory regulated by unexpectedly cross-reactive pathogens. *Nat Immunol* 3, 627-34.

- Bretscher, P. A.** (1999). A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 185-90.
- Brodie, S. J., Lewinsohn, D. A., Patterson, B. K., Jiyamapa, D., Krieger, J., Corey, L., Greenberg, P. D., and Riddell, S. R.** (1999). In vivo migration and function of transferred HIV-1-specific cytotoxic T cells. *Nat Med* 5, 34-41.
- Brodie, S. J., Patterson, B. K., Lewinsohn, D. A., Diem, K., Spach, D., Greenberg, P. D., Riddell, S. R., and Corey, L.** (2000). HIV-specific cytotoxic T lymphocytes traffic to lymph nodes and localize at sites of HIV replication and cell death. *J Clin Invest* 105, 1407-17.
- Brunet, J. F., Denizot, F., Luciani, M. F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M. G., and Golstein, P.** (1987). A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* 328, 267-70.
- Brunner, T., Mogil, R. J., LaFace, D., Yoo, N. J., Mahboubi, A., Echeverri, F., Martin, S. J., Force, W. R., Lynch, D. H., Ware, C. F., and et al.** (1995). Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 373, 441-4.
- Brunner, T., Wasem, C., Torgler, R., Cima, I., Jakob, S., and Corazza, N.** (2003). Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Semin Immunol* 15, 167-76.
- Bukczynski, J., Wen, T., Ellefsen, K., Gaudie, J., and Watts, T. H.** (2004). Costimulatory ligand 4-1BBL (CD137L) as an efficient adjuvant for human antiviral cytotoxic T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1291-6.
- Bukczynski, J., Wen, T., and Watts, T. H.** (2003). Costimulation of human CD28- T cells by 4-1BB ligand. *Eur J Immunol* 33, 446-54.
- Bulfone-Pau, S. S., Bulanova, E., Pohl, T., Budagian, V., Durkop, H., Ruckert, R., Kunzendorf, U., Paus, R., and Krause, H.** (1999). Death deflected: IL-15 inhibits TNF-alpha-mediated apoptosis in fibroblasts by TRAF2 recruitment to the IL-15Ralpha chain. *Faseb J* 13, 1575-85.
- Busch, D. H., and Pamer, E. G.** (1999). T cell affinity maturation by selective expansion during infection. *J Exp Med* 189, 701-10.
- Butcher, E. C., and Picker, L. J.** (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272, 60-6.
- Cai, Z., Brunmark, A., Jackson, M. R., Loh, D., Peterson, P. A., and Sprent, J.** (1996). Transfected Drosophila cells as a probe for defining the minimal requirements for stimulating unprimed CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14736-41.
- Callan, M. F., Tan, L., Annels, N., Ogg, G. S., Wilson, J. D., O'Callaghan, C. A., Steven, N., McMichael, A. J., and Rickinson, A. B.** (1998). Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J Exp Med* 187, 1395-402.
- Cambier, J. C.** (1995). Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J Immunol* 155, 3281-5.
- Campanero, M. R., del Pozo, M. A., Arroyo, A. G., Sanchez-Mateos, P., Hernandez-Caselles, T., Craig, A., Pulido, R., and Sanchez-Madrid, F.** (1993). ICAM-3 interacts with LFA-1 and regulates the LFA-1/ICAM-1 cell adhesion pathway. *J Cell Biol* 123, 1007-16.
- Cannons, J. L., Lau, P., Ghumman, B., DeBenedette, M. A., Yagita, H., Okumura, K., and Watts, T. H.** (2001). 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *J Immunol* 167, 1313-24.
- Carsana, M., Tragni, G., Nicolini, G., Bersani, I., Parmiani, G., Anichini, A., Sun, Y. S., Moller, P., Schadendorf, D., and Sensi, M. L.** (2002). Comparative assessment of TCRBV diversity in T lymphocytes present in blood, metastatic lesions, and DTH sites of two melanoma patients vaccinated with an IL-7 gene-modified autologous tumor cell vaccine. *Cancer Gene Ther* 9, 243-53.
- Carter, L., Fouser, L. A., Jussif, J., Fitz, L., Deng, B., Wood, C. R., Collins, M., Honjo, T., Freeman, G. J., and Carreno, B. M.** (2002). PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol* 32, 634-43.
- Catalina, M. D., Sullivan, J. L., Brody, R. M., and Luzuriaga, K.** (2002). Phenotypic and functional heterogeneity of EBV epitope-specific CD8+ T cells. *J Immunol* 168, 4184-91.
- Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., and Alber, G.** (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 184, 747-52.

- Cerdan, C., Martin, Y., Courcoul, M., Brailly, H., Mawas, C., Birg, F., and Olive, D.** (1992). Prolonged IL-2 receptor alpha/CD25 expression after T cell activation via the adhesion molecules CD2 and CD28. Demonstration of combined transcriptional and post-transcriptional regulation. *J Immunol* 149, 2255-61.
- Cerdan, C., Martin, Y., Courcoul, M., Mawas, C., Birg, F., and Olive, D.** (1995). CD28 costimulation up-regulates long-term IL-2R beta expression in human T cells through combined transcriptional and post-transcriptional regulation. *J Immunol* 154, 1007-13.
- Champagne, P., Ogg, G. S., King, A. S., Knabenhans, C., Ellefsen, K., Nobile, M., Appay, V., Rizzardi, G. P., Fleury, S., Lipp, M., et al.** (2001). Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 410, 106-11.
- Chen, G., Shankar, P., Lange, C., Valdez, H., Skolnik, P. R., Wu, L., Manjunath, N., and Lieberman, J.** (2001). CD8 T cells specific for human immunodeficiency virus, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus lack molecules for homing to lymphoid sites of infection. *Blood* 98, 156-64.
- Cheuk, A. T., Mufti, G. J., and Guinn, B. A.** (2004). Role of 4-1BB:4-1BB ligand in cancer immunotherapy. *Cancer Gene Ther* 11, 215-26.
- Chiong, B., Wong, R., Lee, P., Delto, J., Scotland, R., Lau, R., and Weber, J.** (2004). Characterization of long-term effector-memory T-cell responses in patients with resected high-risk melanoma receiving a melanoma Peptide vaccine. *J Immunother* 27, 368-79.
- Choi, B. K., Bae, J. S., Choi, E. M., Kang, W. J., Sakaguchi, S., Vinay, D. S., and Kwon, B. S.** (2004). 4-1BB-dependent inhibition of immunosuppression by activated CD4+CD25+ T cells. *J Leukoc Biol* 75, 785-91.
- Christen, U., and von Herrath, M. G.** (2004). Induction, acceleration or prevention of autoimmunity by molecular mimicry. *Mol Immunol* 40, 1113-20.
- Clemente, C. G., Mihm, M. C., Jr., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P., and Cascinelli, N.** (1996). Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77, 1303-10.
- Cobbold, M., Khan, N., Pourgheysari, B., Tauro, S., McDonald, D., Osman, H., Assenmacher, M., Billingham, L., Steward, C., Crawley, C., et al.** (2005). Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med* 202, 379-86.
- Collette, Y., Razanajaona, D., Ghiotto, M., and Olive, D.** (1997). CD28 can promote T cell survival through a phosphatidylinositol 3-kinase-independent mechanism. *Eur J Immunol* 27, 3283-9.
- Comoli, P., Labirio, M., Basso, S., Baldanti, F., Grossi, P., Furione, M., Vigano, M., Fiocchi, R., Rossi, G., Ginevri, F., et al.** (2002). Infusion of autologous Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells for prevention of EBV-related lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients with evidence of active virus replication. *Blood* 99, 2592-8.
- Corr, M., Slanetz, A. E., Boyd, L. F., Jelonek, M. T., Khilko, S., al-Ramadi, B. K., Kim, Y. S., Maher, S. E., Bothwell, A. L., and Margulies, D. H.** (1994). T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity. *Science* 265, 946-9.
- Costello, R., Lipcey, C., Algarte, M., Cerdan, C., Baeuerle, P. A., Olive, D., and Imbert, J.** (1993). Activation of primary human T-lymphocytes through CD2 plus CD28 adhesion molecules induces long-term nuclear expression of NF-kappa B. *Cell Growth Differ* 4, 329-39.
- Couedel, C., Bodinier, M., Peyrat, M. A., Bonneville, M., Davodeau, F., and Lang, F.** (1999). Selection and long-term persistence of reactive CTL clones during an EBV chronic response are determined by avidity, CD8 variable contribution compensating for differences in TCR affinities. *J Immunol* 162, 6351-8.
- Dal Porto, J., Johansen, T. E., Catipovic, B., Parfiit, D. J., Tuveson, D., Gether, U., Kozlowski, S., Fearon, D. T., and Schneck, J. P.** (1993). A soluble divalent class I major histocompatibility complex molecule inhibits alloreactive T cells at nanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6671-5.
- Davis, M. M., and Bjorkman, P. J.** (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395-402.
- Davis, M. M., Boniface, J. J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B., and Chien, Y.** (1998). Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16, 523-44.

- Dawicki, W., and Watts, T. H.** (2004). Expression and function of 4-1BB during CD4 versus CD8 T cell responses in vivo. *Eur J Immunol* 34, 743-51.
- Dazzi, F., and Goldman, J. M.** (1998). Adoptive immunotherapy following allogeneic bone marrow transplantation. *Annu Rev Med* 49, 329-40.
- de Fougerolles, A. R., Klickstein, L. B., and Springer, T. A.** (1993). Cloning and expression of intercellular adhesion molecule 3 reveals strong homology to other immunoglobulin family counter-receptors for lymphocyte function-associated antigen 1. *J Exp Med* 177, 1187-92.
- DeBenedette, M. A., Shahinian, A., Mak, T. W., and Watts, T. H.** (1997). Costimulation of CD28-T lymphocytes by 4-1BB ligand. *J Immunol* 158, 551-9.
- DeBenedette, M. A., Wen, T., Bachmann, M. F., Ohashi, P. S., Barber, B. H., Stocking, K. L., Peschon, J. J., and Watts, T. H.** (1999). Analysis of 4-1BB ligand (4-1BBL)-deficient mice and of mice lacking both 4-1BBL and CD28 reveals a role for 4-1BBL in skin allograft rejection and in the cytotoxic T cell response to influenza virus. *J Immunol* 163, 4833-41.
- Del Prete, G., De Carli, M., D'Elia, M. M., Daniel, K. C., Almerigogna, F., Alderson, M., Smith, C. A., Thomas, E., and Romagnani, S.** (1995). CD30-mediated signaling promotes the development of human T helper type 2-like T cells. *J Exp Med* 182, 1655-61.
- Dhein, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K. M., and Krammer, P. H.** (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 373, 438-41.
- Diehl, L., van Mierlo, G. J., den Boer, A. T., van der Voort, E., Fransen, M., van Bostelen, L., Krimpenfort, P., Melief, C. J., Mittler, R., Toes, R. E., and Offringa, R.** (2002). In vivo triggering through 4-1BB enables Th-independent priming of CTL in the presence of an intact CD28 costimulatory pathway. *J Immunol* 168, 3755-62.
- Ding, L., and Shevach, E. M.** (1994). Activation of CD4+ T cells by delivery of the B7 costimulatory signal on bystander antigen-presenting cells (trans-costimulation). *Eur J Immunol* 24, 859-66.
- Ding, Y. H., Smith, K. J., Garboczi, D. N., Utz, U., Biddison, W. E., and Wiley, D. C.** (1998). Two human T cell receptors bind in a similar diagonal mode to the HLA-A2/Tax peptide complex using different TCR amino acids. *Immunity* 8, 403-11.
- DiSanto, J. P., Bonnefoy, J. Y., Gauchat, J. F., Fischer, A., and de Saint Basile, G.** (1993). CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 361, 541-3.
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., and Chen, L.** (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 5, 1365-9.
- Dreno, B., Nguyen, J. M., Khammari, A., Pandolfino, M. C., Tessier, M. H., Bercegeay, S., Cassidanius, A., Lemarre, P., Billaudel, S., Labarriere, N., and Jotereau, F.** (2002). Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 51, 539-46.
- Dudley, E. C., Petrie, H. T., Shah, L. M., Owen, M. J., and Hayday, A. C.** (1994). T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity* 1, 83-93.
- Dudley, M. E., Wunderlich, J., Nishimura, M. I., Yu, D., Yang, J. C., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Sherry, R., et al.** (2001). Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 24, 363-73.
- Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Robbins, P. F., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R., Restifo, N. P., Hubicki, A. M., et al.** (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-4.
- Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Yang, J. C., Sherry, R. M., Topalian, S. L., Restifo, N. P., Royal, R. E., Kammula, U., White, D. E., Mavroukakis, S. A., et al.** (2005). Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 23, 2346-57.
- Dunbar, P. R., Smith, C. L., Chao, D., Salio, M., Shepherd, D., Mirza, F., Lipp, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., Evans, A., et al.** (2000). A shift in the phenotype of melan-A-specific CTL identifies melanoma patients with an active tumor-specific immune response. *J Immunol* 165, 6644-52.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., and Schreiber, R. D.** (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3, 991-8.

- Dunne, P. J., Faint, J. M., Gudgeon, N. H., Fletcher, J. M., Plunkett, F. J., Soares, M. V., Hislop, A. D., Annels, N. E., Rickinson, A. B., Salmon, M., and Akbar, A. N.** (2002). Epstein-Barr virus-specific CD8(+) T cells that re-express CD45RA are apoptosis-resistant memory cells that retain replicative potential. *Blood* 100, 933-40.
- Dupont, J., Latouche, J. B., Ma, C., and Sadelain, M.** (2005). Artificial antigen-presenting cells transduced with telomerase efficiently expand epitope-specific, human leukocyte antigen-restricted cytotoxic T cells. *Cancer Res* 65, 5417-27.
- Dustin, M. L., Olive, D., and Springer, T. A.** (1989a). Correlation of CD2 binding and functional properties of multimeric and monomeric lymphocyte function-associated antigen 3. *J Exp Med* 169, 503-17.
- Dustin, M. L., and Springer, T. A.** (1989b). T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 341, 619-24.
- Dutcher, J. P., Gaynor, E. R., Boldt, D. H., Doroshow, J. H., Bar, M. H., Sznol, M., Mier, J., Sparano, J., Fisher, R. I., Weiss, G., and et al.** (1991). A phase II study of high-dose continuous infusion interleukin-2 with lymphokine-activated killer cells in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 9, 641-8.
- Ebnet, K., Hausmann, M., Lehmann-Grube, F., Mullbacher, A., Kopf, M., Lamers, M., and Simon, M. M.** (1995). Granzyme A-deficient mice retain potent cell-mediated cytotoxicity. *Embo J* 14, 4230-9.
- Einsele, H., Roosnek, E., Rufer, N., Sinzger, C., Riegler, S., Loffler, J., Grigoleit, U., Moris, A., Rammensee, H. G., Kanz, L., et al.** (2002). Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 99, 3916-22.
- Elices, M. J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse, C., Luhowskyj, S., Hemler, M. E., and Lobb, R. R.** (1990). VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 60, 577-84.
- Emanuel, D. J., Lucas, K. G., Mallory, G. B., Jr., Edwards-Brown, M. K., Pollok, K. E., Conrad, P. D., Robertson, K. A., and Smith, F. O.** (1997). Treatment of posttransplant lymphoproliferative disease in the central nervous system of a lung transplant recipient using allogeneic leukocytes. *Transplantation* 63, 1691-4.
- Ferrara, J. L., and Deeg, H. J.** (1991). Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 324, 667-74.
- Fischer, A., Blanche, S., Le Bidois, J., Bordigoni, P., Garnier, J. L., Niaudet, P., Morinet, F., Le Deist, F., Fischer, A. M., Griscelli, C., and et al.** (1991). Anti-B-cell monoclonal antibodies in the treatment of severe B-cell lymphoproliferative syndrome following bone marrow and organ transplantation. *N Engl J Med* 324, 1451-6.
- Foell, J., Strahotin, S., O'Neil, S. P., McCausland, M. M., Suwyn, C., Haber, M., Chander, P. N., Bapat, A. S., Yan, X. J., Chiorazzi, N., et al.** (2003). CD137 costimulatory T cell receptor engagement reverses acute disease in lupus-prone NZB x NZW F1 mice. *J Clin Invest* 111, 1505-18.
- Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., and Lipp, M.** (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99, 23-33.
- Fraser, J. D., Straus, D., and Weiss, A.** (1993). Signal transduction events leading to T-cell lymphokine gene expression. *Immunol Today* 14, 357-62.
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., et al.** (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192, 1027-34.
- Futagawa, T., Akiba, H., Kodama, T., Takeda, K., Hosoda, Y., Yagita, H., and Okumura, K.** (2002). Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. *Int Immunol* 14, 275-86.
- Gallot, G., Vivien, R., Ibisch, C., Lule, J., Davrinche, C., Gaschet, J., and Vie, H.** (2001). Purification of Ag-specific T lymphocytes after direct peripheral blood mononuclear cell stimulation followed by CD25 selection. I. Application to CD4(+) or CD8(+) cytomegalovirus phosphoprotein pp65 epitope determination. *J Immunol* 167, 4196-206.

- Gamadia, L. E., Remmerswaal, E. B., Weel, J. F., Bemelman, F., van Lier, R. A., and Ten Berge, I. J.** (2003). Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease. *Blood* 101, 2686-92.
- Gamadia, L. E., Rentenaar, R. J., Baars, P. A., Remmerswaal, E. B., Surachno, S., Weel, J. F., Toebes, M., Schumacher, T. N., ten Berge, I. J., and van Lier, R. A.** (2001). Differentiation of cytomegalovirus-specific CD8(+) T cells in healthy and immunosuppressed virus carriers. *Blood* 98, 754-61.
- Garboczi, D. N., Utz, U., Ghosh, P., Seth, A., Kim, J., VanTienhoven, E. A., Biddison, W. E., and Wiley, D. C.** (1996). Assembly, specific binding, and crystallization of a human TCR-alpha-beta with an antigenic Tax peptide from human T lymphotropic virus type 1 and the class I MHC molecule HLA-A2. *J Immunol* 157, 5403-10.
- Garcia, K. C., Degano, M., Stanfield, R. L., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A., Teyton, L., and Wilson, I. A.** (1996). An alpha-beta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 274, 209-19.
- Garcia-Lora, A., Algarra, I., and Garrido, F.** (2003). MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol* 195, 346-55.
- Garni-Wagner, B. A., Lee, Z. H., Kim, Y. J., Wilde, C., Kang, C. Y., and Kwon, B. S.** (1996). 4-1BB is expressed on CD45RAhiROhi transitional T cell in humans. *Cell Immunol* 169, 91-8.
- Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y., and Figdor, C. G.** (2000). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100, 575-85.
- Germeau, C., Ma, W., Schiavetti, F., Lurquin, C., Henry, E., Vigneron, N., Brasseur, F., Lethe, B., De Plaen, E., Velu, T., *et al.*** (2005). High frequency of antitumor T cells in the blood of melanoma patients before and after vaccination with tumor antigens. *J Exp Med* 201, 241-8.
- Gervois, N., Labarriere, N., Le Guiner, S., Pandolfino, M. C., Fonteneau, J. F., Guilloux, Y., Diez, E., Dreno, B., and Jotereau, F.** (2000). High avidity melanoma-reactive cytotoxic T lymphocytes are efficiently induced from peripheral blood lymphocytes on stimulation by peptide-pulsed melanoma cells. *Clin Cancer Res* 6, 1459-67.
- Giannoni, F., Barnett, J., Bi, K., Samodal, R., Lanza, P., Marchese, P., Billetta, R., Vita, R., Klein, M. R., Prakken, B., *et al.*** (2005). Clustering of T cell ligands on artificial APC membranes influences T cell activation and protein kinase C theta translocation to the T cell plasma membrane. *J Immunol* 174, 3204-11.
- Giri, J. G., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K., Kumaki, S., Namen, A., Park, L. S., Cosman, D., and Anderson, D.** (1994). Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *Embo J* 13, 2822-30.
- Goedert, J. J., Cote, T. R., Virgo, P., Scoppa, S. M., Kingma, D. W., Gail, M. H., Jaffe, E. S., and Biggar, R. J.** (1998). Spectrum of AIDS-associated malignant disorders. *Lancet* 351, 1833-9.
- Goldrath, A. W., Sivakumar, P. V., Glaccum, M., Kennedy, M. K., Bevan, M. J., Benoist, C., Mathis, D., and Butz, E. A.** (2002). Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *J Exp Med* 195, 1515-22.
- Goodwin, R. G., Alderson, M. R., Smith, C. A., Armitage, R. J., VandenBos, T., Jerzy, R., Tough, T. W., Schoenborn, M. A., Davis-Smith, T., Hennen, K., and *et al.*** (1993a). Molecular and biological characterization of a ligand for CD27 defines a new family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Cell* 73, 447-56.
- Goodwin, R. G., Din, W. S., Davis-Smith, T., Anderson, D. M., Gimpel, S. D., Sato, T. A., Maliszewski, C. R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A.** (1993b). Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Eur J Immunol* 23, 2631-41.
- Gordon, J.** (1995). CD40 and its ligand: central players in B lymphocyte survival, growth, and differentiation. *Blood Rev* 9, 53-6.
- Gorsch, S. M., Memoli, V. A., Stukel, T. A., Gold, L. I., and Arrick, B. A.** (1992). Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res* 52, 6949-52.

- Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., and Dustin, M. L.** (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-7.
- Gramaglia, I., Cooper, D., Miner, K. T., Kwon, B. S., and Croft, M.** (2000). Co-stimulation of antigen-specific CD4 T cells by 4-1BB ligand. *Eur J Immunol* 30, 392-402.
- Gravestien, L. A., Blom, B., Nolten, L. A., de Vries, E., van der Horst, G., Ossendorp, F., Borst, J., and Loenen, W. A.** (1993). Cloning and expression of murine CD27: comparison with 4-1BB, another lymphocyte-specific member of the nerve growth factor receptor family. *Eur J Immunol* 23, 943-50.
- Greene, W. C., Robb, R. J., Svetlik, P. B., Rusk, C. M., Depper, J. M., and Leonard, W. J.** (1985). Stable expression of cDNA encoding the human interleukin 2 receptor in eukaryotic cells. *J Exp Med* 162, 363-8.
- Greten, T. F., Slansky, J. E., Kubota, R., Soldan, S. S., Jaffee, E. M., Leist, T. P., Pardoll, D. M., Jacobson, S., and Schneck, J. P.** (1998). Direct visualization of antigen-specific T cells: HTLV-1 Tax11-19- specific CD8(+) T cells are activated in peripheral blood and accumulate in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7568-73.
- Grimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, H. Z., and Rosenberg, S. A.** (1982). Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 155, 1823-41.
- Gross, T. G., Hinrichs, S. H., Winner, J., Greiner, T. C., Kaufman, S. S., Sammut, P. H., and Langnas, A. N.** (1998). Treatment of post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD) following solid organ transplantation with low-dose chemotherapy. *Ann Oncol* 9, 339-40.
- Guermontprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S.** (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20, 621-67.
- Hamann, D., Baars, P. A., Rep, M. H., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S. R., Klein, M. R., and van Lier, R. A.** (1997). Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med* 186, 1407-18.
- Haque, T., Amlot, P. L., Helling, N., Thomas, J. A., Sweny, P., Rolles, K., Burroughs, A. K., Prentice, H. G., and Crawford, D. H.** (1998). Reconstitution of EBV-specific T cell immunity in solid organ transplant recipients. *J Immunol* 160, 6204-9.
- Hathcock, K. S., Laszlo, G., Pucillo, C., Linsley, P., and Hodes, R. J.** (1994). Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med* 180, 631-40.
- Helgason, C. D., Prendergast, J. A., Berke, G., and Bleackley, R. C.** (1992). Peritoneal exudate lymphocyte and mixed lymphocyte culture hybridomas are cytolytic in the absence of cytotoxic cell proteinases and perforin. *Eur J Immunol* 22, 3187-90.
- Hendriks, J., Xiao, Y., and Borst, J.** (2003). CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *J Exp Med* 198, 1369-80.
- Hernandez-Caselles, T., Rubio, G., Campanero, M. R., del Pozo, M. A., Muro, M., Sanchez-Madrid, F., and Aparicio, P.** (1993). ICAM-3, the third LFA-1 counterreceptor, is a co-stimulatory molecule for both resting and activated T lymphocytes. *Eur J Immunol* 23, 2799-806.
- Hersey, P., and Zhang, X. D.** (2001). How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat Rev Cancer* 1, 142-50.
- Heslop, H. E., Brenner, M. K., and Rooney, C. M.** (1994). Donor T cells to treat EBV-associated lymphoma. *N Engl J Med* 331, 679-80.
- Heusel, J. W., Wesselschmidt, R. L., Shresta, S., Russell, J. H., and Ley, T. J.** (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 76, 977-87.
- Hintzen, R. Q., de Jong, R., Lens, S. M., and van Lier, R. A.** (1994). CD27: marker and mediator of T-cell activation? *Immunol Today* 15, 307-11.
- Hirano, F., Kaneko, K., Tamura, H., Dong, H., Wang, S., Ichikawa, M., Rietz, C., Flies, D. B., Lau, J. S., Zhu, G., et al.** (2005). Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res* 65, 1089-96.

- Hislop, A. D., Annels, N. E., Gudgeon, N. H., Leese, A. M., and Rickinson, A. B.** (2002). Epitope-specific evolution of human CD8(+) T cell responses from primary to persistent phases of Epstein-Barr virus infection. *J Exp Med* 195, 893-905.
- Hislop, A. D., Gudgeon, N. H., Callan, M. F., Fazou, C., Hasegawa, H., Salmon, M., and Rickinson, A. B.** (2001). EBV-specific CD8+ T cell memory: relationships between epitope specificity, cell phenotype, and immediate effector function. *J Immunol* 167, 2019-29.
- Holler, N., Tardivel, A., Kovacsovics-Bankowski, M., Hertig, S., Gaide, O., Martinon, F., Tinel, A., Deperthes, D., Calderara, S., Schulthess, T., *et al.*** (2003). Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol* 23, 1428-40.
- Hurtado, J. C., Kim, S. H., Pollok, K. E., Lee, Z. H., and Kwon, B. S.** (1995). Potential role of 4-1BB in T cell activation. Comparison with the costimulatory molecule CD28. *J Immunol* 155, 3360-7.
- Hurtado, J. C., Kim, Y. J., and Kwon, B. S.** (1997). Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. *J Immunol* 158, 2600-9.
- Hutloff, A., Dittrich, A. M., Beier, K. C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., and Kroczek, R. A.** (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263-6.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.*** (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-5.
- Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., and Minato, N.** (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12293-7.
- Janeway, C. A., Jr. (2003). Immunobiology. The Immune System in Health and Disease).
- Jeremias, I., Herr, I., Boehler, T., and Debatin, K. M.** (1998). TRAIL/Apo-2-ligand-induced apoptosis in human T cells. *Eur J Immunol* 28, 143-52.
- Ji, H. B., Liao, G., Faubion, W. A., Abadia-Molina, A. C., Cozzo, C., Laroux, F. S., Caton, A., and Terhorst, C.** (2004). Cutting edge: the natural ligand for glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein abrogates regulatory T cell suppression. *J Immunol* 172, 5823-7.
- Jotereau, F., Pandolfino, M. C., Boudart, D., Diez, E., Dreno, B., Douillard, J. Y., Muller, J. Y., and LeMevel, B.** (1991). High-fold expansion of human cytotoxic T-lymphocytes specific for autologous melanoma cells for use in immunotherapy. *J Immunother* 10, 405-11.
- Ju, S. T., Panka, D. J., Cui, H., Ettinger, R., el-Khatib, M., Sherr, D. H., Stanger, B. Z., and Marshak-Rothstein, A.** (1995). Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 373, 444-8.
- Juan, M., Vinas, O., Pino-Otin, M. R., Places, L., Martinez-Caceres, E., Barcelo, J. J., Miralles, A., Vilella, R., de la Fuente, M. A., Vives, J., and *et al.*** (1994). CD50 (intercellular adhesion molecule 3) stimulation induces calcium mobilization and tyrosine phosphorylation through p59fyn and p56lck in Jurkat T cell line. *J Exp Med* 179, 1747-56.
- Judge, A. D., Zhang, X., Fujii, H., Surh, C. D., and Sprent, J.** (2002). Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. *J Exp Med* 196, 935-46.
- Kaech, S. M., and Ahmed, R.** (2001). Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* 2, 415-22.
- Kaech, S. M., Tan, J. T., Wherry, E. J., Konieczny, B. T., Surh, C. D., and Ahmed, R.** (2003). Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* 4, 1191-8.
- Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K. J., Podack, E. R., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H.** (1994). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369, 31-7.
- Kanamaru, F., Youngnak, P., Hashiguchi, M., Nishioka, T., Takahashi, T., Sakaguchi, S., Ishikawa, I., and Azuma, M.** (2004). Costimulation via glucocorticoid-induced TNF receptor in both conventional and CD25+ regulatory CD4+ T cells. *J Immunol* 172, 7306-14.
- Kannagi, R.** (2002). Regulatory roles of carbohydrate ligands for selectins in the homing of lymphocytes. *Curr Opin Struct Biol* 12, 599-608.

- Kasaian, M. T., Whitters, M. J., Carter, L. L., Lowe, L. D., Jussif, J. M., Deng, B., Johnson, K. A., Witek, J. S., Senices, M., Konz, R. F., et al.** (2002). IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity* 16, 559-69.
- Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Kikutani, H.** (1994). The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1, 167-78.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Jennings, C., Sakaguchi, K., Kang, X., Southwood, S., Robbins, P. F., Sette, A., Appella, E., and Rosenberg, S. A.** (1995). Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J Immunol* 154, 3961-8.
- Kennedy, M. K., Glaccum, M., Brown, S. N., Butz, E. A., Viney, J. L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C. R., et al.** (2000). Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* 191, 771-80.
- Kern, F., Bunde, T., Faulhaber, N., Kiecker, F., Khatamzas, E., Rudawski, I. M., Pruss, A., Gratama, J. W., Volkmer-Engert, R., Ewert, R., et al.** (2002). Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. *J Infect Dis* 185, 1709-16.
- Khaled, A. R., and Durum, S. K.** (2002). Lymphocide: cytokines and the control of lymphoid homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2, 817-30.
- Kienzle, G., and von Kempis, J.** (2000). CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. *Int Immunol* 12, 73-82.
- Kim, J., Choi, W. S., La, S., Suh, J. H., Kim, B. S., Cho, H. R., Kwon, B. S., and Kwon, B.** (2005). Stimulation with 4-1BB (CD137) inhibits chronic graft-versus-host disease by inducing activation-induced cell death of donor CD4+ T cells. *Blood* 105, 2206-13.
- Kim, Y. J., Brutkiewicz, R. R., and Broxmeyer, H. E.** (2002). Role of 4-1BB (CD137) in the functional activation of cord blood CD28(-)CD8(+) T cells. *Blood* 100, 3253-60.
- Kim, Y. J., Stringfield, T. M., Chen, Y., and Broxmeyer, H. E.** (2004). Modulation of Cord Blood CD8+ T cell Effector Differentiation by TGF- β 1 and 4-1BB Costimulation. *Blood*.
- Koenig, S., Conley, A. J., Brewah, Y. A., Jones, G. M., Leath, S., Boots, L. J., Davey, V., Pantaleo, G., Demarest, J. F., Carter, C., and et al.** (1995). Transfer of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes to an AIDS patient leads to selection for mutant HIV variants and subsequent disease progression. *Nat Med* 1, 330-6.
- Kolb, H. J., Schattenberg, A., Goldman, J. M., Hertenstein, B., Jacobsen, N., Arcese, W., Ljungman, P., Ferrant, A., Verdonck, L., Niederwieser, D., et al.** (1995). Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 86, 2041-50.
- Kopf, M., Coyle, A. J., Schmitz, N., Barner, M., Oxenius, A., Gallimore, A., Gutierrez-Ramos, J. C., and Bachmann, M. F.** (2000). Inducible costimulator protein (ICOS) controls T helper cell subset polarization after virus and parasite infection. *J Exp Med* 192, 53-61.
- Kopf, M., Ruedl, C., Schmitz, N., Gallimore, A., Lefrang, K., Ecabert, B., Odermatt, B., and Bachmann, M. F.** (1999). OX40-deficient mice are defective in Th cell proliferation but are competent in generating B cell and CTL Responses after virus infection. *Immunity* 11, 699-708.
- Krammer, P. H.** (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-95.
- Kruit, W. H., Goey, S. H., Lamers, C. H., Gratama, J. W., Visser, B., Schmitz, P. I., Eggermont, A. M., Bolhuis, R. L., and Stoter, G.** (1997). High-dose regimen of interleukin-2 and interferon-alpha in combination with lymphokine-activated killer cells in patients with metastatic renal cell cancer. *J Immunother* 20, 312-20.
- Krummel, M. F., and Allison, J. P.** (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 182, 459-65.
- Ku, C. C., Murakami, M., Sakamoto, A., Kappler, J., and Marrack, P.** (2000). Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science* 288, 675-8.
- Kuijpers, T. W., Vossen, M. T., Gent, M. R., Davin, J. C., Roos, M. T., Wertheim-van Dillen, P. M., Weel, J. F., Baars, P. A., and van Lier, R. A.** (2003). Frequencies of circulating cytolytic, CD45RA+CD27-, CD8+ T lymphocytes depend on infection with CMV. *J Immunol* 170, 4342-8.

- Kundig, T. M., Schorle, H., Bachmann, M. F., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M., and Horak, I.** (1993). Immune responses in interleukin-2-deficient mice. *Science* 262, 1059-61.
- Kwon, B., Lee, H. W., and Kwon, B. S.** (2002a). New insights into the role of 4-1BB in immune responses: beyond CD8⁺ T cells. *Trends Immunol* 23, 378-80.
- Kwon, B., Yu, K. Y., Ni, J., Yu, G. L., Jang, I. K., Kim, Y. J., Xing, L., Liu, D., Wang, S. X., and Kwon, B. S.** (1999). Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand. *J Biol Chem* 274, 6056-61.
- Kwon, B. S., Hurtado, J. C., Lee, Z. H., Kwack, K. B., Seo, S. K., Choi, B. K., Koller, B. H., Wolisi, G., Broxmeyer, H. E., and Vinay, D. S.** (2002b). Immune responses in 4-1BB (CD137)-deficient mice. *J Immunol* 168, 5483-90.
- Kwon, B. S., and Weissman, S. M.** (1989). cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1963-7.
- La, S., Kim, J., Kwon, B. S., and Kwon, B.** (2002). Herpes simplex virus type 1 glycoprotein D inhibits T-cell proliferation. *Mol Cells* 14, 398-403.
- Labarriere, N., Pandolfino, M. C., Gervois, N., Khammari, A., Tessier, M. H., Dreno, B., and Jotereau, F.** (2002). Therapeutic efficacy of melanoma-reactive TIL injected in stage III melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 51, 532-8.
- Labarriere, N., Pandolfino, M. C., Raingeard, D., Le Guiner, S., Diez, E., Le Drean, E., Dreno, B., and Jotereau, F.** (1998). Frequency and relative fraction of tumor antigen-specific T cells among lymphocytes from melanoma-invaded lymph nodes. *Int J Cancer* 78, 209-15.
- Laderach, D., Wesa, A., and Galy, A.** (2003). 4-1BB-ligand is regulated on human dendritic cells and induces the production of IL-12. *Cell Immunol* 226, 37-44.
- Lang, F., and Bodinier, M.** (2001). MHC-peptide multimers: tools of choice for detecting and sorting antigen-specific T-cells. *Transfusion* 41, 687-90.
- Lang, K. S., Recher, M., Navarini, A. A., Harris, N. L., Lohning, M., Junt, T., Probst, H. C., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M.** (2005). Inverse correlation between IL-7 receptor expression and CD8 T cell exhaustion during persistent antigen stimulation. *Eur J Immunol* 35, 738-45.
- Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A. J., Brown, J. A., Nunes, R., *et al.*** (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2, 261-8.
- Latouche, J. B., and Sadelain, M.** (2000). Induction of human cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells. *Nat Biotechnol* 18, 405-9.
- Le Gal, F. A., Avril, M. F., Bosq, J., Lefebvre, P., Deschemin, J. C., Andrieu, M., Dore, M. X., and Guillet, J. G.** (2001). Direct evidence to support the role of antigen-specific CD8(+) T cells in melanoma-associated vitiligo. *J Invest Dermatol* 117, 1464-70.
- Leach, D. R., Krummel, M. F., and Allison, J. P.** (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271, 1734-6.
- Lee, H. W., Park, S. J., Choi, B. K., Kim, H. H., Nam, K. O., and Kwon, B. S.** (2002a). 4-1BB promotes the survival of CD8⁺ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol* 169, 4882-8.
- Lee, K. H., Holdorf, A. D., Dustin, M. L., Chan, A. C., Allen, P. M., and Shaw, A. S.** (2002b). T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 295, 1539-42.
- Lee, K. H., Panelli, M. C., Kim, C. J., Riker, A. I., Bettinotti, M. P., Roden, M. M., Fetsch, P., Abati, A., Rosenberg, S. A., and Marincola, F. M.** (1998). Functional dissociation between local and systemic immune response during anti-melanoma peptide vaccination. *J Immunol* 161, 4183-94.
- Lee, P. K., Chang, C. J., and Lin, C. M.** (2003). Lipopolysaccharide preferentially induces 4-1BB ligand expression on human monocyte-derived dendritic cells. *Immunol Lett* 90, 215-21.
- Lee, P. P., Yee, C., Savage, P. A., Fong, L., Brockstedt, D., Weber, J. S., Johnson, D., Swetter, S., Thompson, J., Greenberg, P. D., *et al.*** (1999). Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med* 5, 677-85.
- Lenardo, M. J.** (1996). Fas and the art of lymphocyte maintenance. *J Exp Med* 183, 721-4.
- Lens, S. M., Tesselaar, K., van Oers, M. H., and van Lier, R. A.** (1998). Control of lymphocyte function through CD27-CD70 interactions. *Semin Immunol* 10, 491-9.

- Li, C. R., Greenberg, P. D., Gilbert, M. J., Goodrich, J. M., and Riddell, S. R.** (1994). Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood* 83, 1971-9.
- Li, J., Huston, G., and Swain, S. L.** (2003a). IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells. *J Exp Med* 198, 1807-15.
- Li, Q., Carr, A., Ito, F., Teitz-Tennenbaum, S., and Chang, A. E.** (2003b). Polarization effects of 4-1BB during CD28 costimulation in generating tumor-reactive T cells for cancer immunotherapy. *Cancer Res* 63, 2546-52.
- Li, X. C., Demirci, G., Ferrari-Lacraz, S., Groves, C., Coyle, A., Malek, T. R., and Strom, T. B.** (2001). IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo. *Nat Med* 7, 114-8.
- Li, Y., Zhi, W., Wareski, P., and Weng, N. P.** (2005). IL-15 activates telomerase and minimizes telomere loss and may preserve the replicative life span of memory CD8+ T cells in vitro. *J Immunol* 174, 4019-24.
- Lieberman, J.** (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 3, 361-70.
- Lieberman, J., Skolnik, P. R., Parkerson, G. R., 3rd, Fabry, J. A., Landry, B., Bethel, J., and Kagan, J.** (1997). Safety of autologous, ex vivo-expanded human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T-lymphocyte infusion in HIV-infected patients. *Blood* 90, 2196-206.
- Lin, J. X., Migone, T. S., Tsang, M., Friedmann, M., Weatherbee, J. A., Zhou, L., Yamauchi, A., Bloom, E. T., Mietz, J., John, S., and et al.** (1995). The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity* 2, 331-9.
- Linsley, P. S., Bradshaw, J., Urnes, M., Grosmaire, L., and Ledbetter, J. A.** (1993). CD28 engagement by B7/BB-1 induces transient down-regulation of CD28 synthesis and prolonged unresponsiveness to CD28 signaling. *J Immunol* 150, 3161-9.
- Linsley, P. S., Greene, J. L., Brady, W., Bajorath, J., Ledbetter, J. A., and Peach, R.** (1994). Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1, 793-801.
- Linton, P. J., Bautista, B., Biederman, E., Bradley, E. S., Harbertson, J., Kondrack, R. M., Padrick, R. C., and Bradley, L. M.** (2003). Costimulation via OX40L expressed by B cells is sufficient to determine the extent of primary CD4 cell expansion and Th2 cytokine secretion in vivo. *J Exp Med* 197, 875-83.
- Liu, X., Bai, X. F., Wen, J., Gao, J. X., Liu, J., Lu, P., Wang, Y., Zheng, P., and Liu, Y.** (2001). B7H costimulates clonal expansion of, and cognate destruction of tumor cells by, CD8(+) T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* 194, 1339-48.
- Liu, Y., and Janeway, C. A., Jr.** (1992). Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3845-9.
- Lodolce, J. P., Boone, D. L., Chai, S., Swain, R. E., Dassopoulos, T., Trettin, S., and Ma, A.** (1998). IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 9, 669-76.
- Lollo, B. A., Chan, K. W., Hanson, E. M., Moy, V. T., and Brian, A. A.** (1993). Direct evidence for two affinity states for lymphocyte function-associated antigen 1 on activated T cells. *J Biol Chem* 268, 21693-700.
- Lucas, K. G., Small, T. N., Heller, G., Dupont, B., and O'Reilly, R. J.** (1996). The development of cellular immunity to Epstein-Barr virus after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 87, 2594-603.
- Lurquin, C., Lethe, B., De Plaen, E., Corbiere, V., Theate, I., van Baren, N., Coulie, P. G., and Boon, T.** (2005). Contrasting frequencies of antitumor and anti-vaccine T cells in metastases of a melanoma patient vaccinated with a MAGE tumor antigen. *J Exp Med* 201, 249-57.
- Ma, H. L., Whitters, M. J., Konz, R. F., Senices, M., Young, D. A., Grusby, M. J., Collins, M., and Dunussi-Joannopoulos, K.** (2003). IL-21 activates both innate and adaptive immunity to generate potent antitumor responses that require perforin but are independent of IFN-gamma. *J Immunol* 171, 608-15.

- Madakamutil, L. T., Christen, U., Lena, C. J., Wang-Zhu, Y., Attinger, A., Sundarrajan, M., Ellmeier, W., von Herrath, M. G., Jensen, P., Littman, D. R., and Cheroutre, H.** (2004). CD8 α mediated survival and differentiation of CD8 memory T cell precursors. *Science* *304*, 590-3.
- Malissen, M., Trucy, J., Jouvin-Marche, E., Cazenave, P. A., Scollay, R., and Malissen, B.** (1992). Regulation of TCR alpha and beta gene allelic exclusion during T-cell development. *Immunol Today* *13*, 315-22.
- Mallard, E., Vernel-Pauillac, F., Velu, T., Lehmann, F., Abastado, J. P., Salcedo, M., and Bercovici, N.** (2004). IL-2 production by virus- and tumor-specific human CD8 T cells is determined by their fine specificity. *J Immunol* *172*, 3963-70.
- Maraninchi, D., Gluckman, E., Blaise, D., Guyotat, D., Rio, B., Pico, J. L., Leblond, V., Michallet, M., Dreyfus, F., Ifrah, N., and et al.** (1987). Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias. *Lancet* *2*, 175-8.
- Marks-Konczalik, J., Dubois, S., Losi, J. M., Sabzevari, H., Yamada, N., Feigenbaum, L., Waldmann, T. A., and Tagaya, Y.** (2000). IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 11445-50.
- Marrack, P., Bender, J., Hildeman, D., Jordan, M., Mitchell, T., Murakami, M., Sakamoto, A., Schaefer, B. C., Swanson, B., and Kappler, J.** (2000). Homeostasis of alpha beta TCR⁺ T cells. *Nat Immunol* *1*, 107-11.
- Martinet, O., Ermekova, V., Qiao, J. Q., Sauter, B., Mandeli, J., Chen, L., and Chen, S. H.** (2000). Immunomodulatory gene therapy with interleukin 12 and 4-1BB ligand: long- term remission of liver metastases in a mouse model. *J Natl Cancer Inst* *92*, 931-6.
- Mason, D.** (1998). A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol Today* *19*, 395-404.
- Matano, T., Shibata, R., Siemon, C., Connors, M., Lane, H. C., and Martin, M. A.** (1998). Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *J Virol* *72*, 164-9.
- Maus, M. V., Thomas, A. K., Leonard, D. G., Allman, D., Addya, K., Schlienger, K., Riley, J. L., and June, C. H.** (2002). Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB. *Nat Biotechnol* *20*, 143-8.
- McAdam, A. J., Greenwald, R. J., Levin, M. A., Chernova, T., Malenkovich, N., Ling, V., Freeman, G. J., and Sharpe, A. H.** (2001). ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* *409*, 102-5.
- Medema, J. P., and Borst, J.** (1999). T cell signaling: a decision of life and death. *Hum Immunol* *60*, 403-11.
- Meidenbauer, N., Marienhagen, J., Laumer, M., Vogl, S., Heymann, J., Andreesen, R., and Mackensen, A.** (2003). Survival and tumor localization of adoptively transferred Melan-A-specific T cells in melanoma patients. *J Immunol* *170*, 2161-9.
- Melchionda, F., Fry, T. J., Milliron, M. J., McKirdy, M. A., Tagaya, Y., and Mackall, C. L.** (2005). Adjuvant IL-7 or IL-15 overcomes immunodominance and improves survival of the CD8⁺ memory cell pool. *J Clin Invest* *115*, 1177-87.
- Melero, I., Johnston, J. V., Shufford, W. W., Mittler, R. S., and Chen, L.** (1998). NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies. *Cell Immunol* *190*, 167-72.
- Melero, I., Shufford, W. W., Newby, S. A., Aruffo, A., Ledbetter, J. A., Hellstrom, K. E., Mittler, R. S., and Chen, L.** (1997). Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* *3*, 682-5.
- Meuer, S. C., Hussey, R. E., Fabbi, M., Fox, D., Acuto, O., Fitzgerald, K. A., Hodgdon, J. C., Protentis, J. P., Schlossman, S. F., and Reinherz, E. L.** (1984). An alternative pathway of T-cell activation: a functional role for the 50 kd T11 sheep erythrocyte receptor protein. *Cell* *36*, 897-906.
- Mitchell, M. S., Darrah, D., Yeung, D., Halpern, S., Wallace, A., Volland, J., Jones, V., and Kan-Mitchell, J.** (2002). Phase I trial of adoptive immunotherapy with cytolytic T lymphocytes immunized against a tyrosinase epitope. *J Clin Oncol* *20*, 1075-86.

- Mittler, R. S., Bailey, T. S., Klussman, K., Trailsmith, M. D., and Hoffmann, M. K. (1999). Anti-4-1BB monoclonal antibodies abrogate T cell-dependent humoral immune responses in vivo through the induction of helper T cell anergy. *J Exp Med* 190, 1535-40.
- Moebius, U., Kober, G., Griscelli, A. L., Hercend, T., and Meuer, S. C. (1991). Expression of different CD8 isoforms on distinct human lymphocyte subpopulations. *Eur J Immunol* 21, 1793-800.
- Mollereau, B., Deckert, M., Deas, O., Rieux-Laucat, F., Hirsch, F., Bernard, A., Fischer, A., Lynch, D. H., Charpentier, B., Le Deist, F., and Senik, A. (1996). CD2-induced apoptosis in activated human peripheral T cells: a Fas-independent pathway that requires early protein tyrosine phosphorylation. *J Immunol* 156, 3184-90.
- Moniuszko, M., Fry, T., Tsai, W. P., Morre, M., Assouline, B., Cortez, P., Lewis, M. G., Cairns, S., Mackall, C., and Franchini, G. (2004). Recombinant interleukin-7 induces proliferation of naive macaque CD4+ and CD8+ T cells in vivo. *J Virol* 78, 9740-9.
- Monsurro, V., Nagorsen, D., Wang, E., Provenzano, M., Dudley, M. E., Rosenberg, S. A., and Marincola, F. M. (2002). Functional heterogeneity of vaccine-induced CD8(+) T cells. *J Immunol* 168, 5933-42.
- Monteiro, J., Batliwalla, F., Ostrer, H., and Gregersen, P. K. (1996). Shortened telomeres in clonally expanded CD28-CD8+ T cells imply a replicative history that is distinct from their CD28+CD8+ counterparts. *J Immunol* 156, 3587-90.
- Montoya, M. C., Sancho, D., Bonello, G., Collette, Y., Langlet, C., He, H. T., Aparicio, P., Alcover, A., Olive, D., and Sanchez-Madrid, F. (2002). Role of ICAM-3 in the initial interaction of T lymphocytes and APCs. *Nat Immunol* 3, 159-68.
- Morel, Y., Truneh, A., Sweet, R. W., Olive, D., and Costello, R. T. (2001). The TNF superfamily members LIGHT and CD154 (CD40 ligand) costimulate induction of dendritic cell maturation and elicit specific CTL activity. *J Immunol* 167, 2479-86.
- Mortarini, R., Piris, A., Maurichi, A., Molla, A., Bersani, I., Bono, A., Bartoli, C., Santinami, M., Lombardo, C., Ravagnani, F., *et al.* (2003). Lack of terminally differentiated tumor-specific CD8+ T cells at tumor site in spite of antitumor immunity to self-antigens in human metastatic melanoma. *Cancer Res* 63, 2535-45.
- Mueller, Y. M., Makar, V., Bojczuk, P. M., Witek, J., and Katsikis, P. D. (2003). IL-15 enhances the function and inhibits CD95/Fas-induced apoptosis of human CD4+ and CD8+ effector-memory T cells. *Int Immunol* 15, 49-58.
- Mueller, Y. M., Petrovas, C., Bojczuk, P. M., Dimitriou, I. D., Beer, B., Silvera, P., Villinger, F., Cairns, J. S., Gracely, E. J., Lewis, M. G., and Katsikis, P. D. (2005). Interleukin-15 increases effector memory CD8+ t cells and NK Cells in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Virol* 79, 4877-85.
- Mule, J. J., Shu, S., Schwarz, S. L., and Rosenberg, S. A. (1984). Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin-2. *Science* 225, 1487-9.
- Murali-Krishna, K., Lau, L. L., Sambhara, S., Lemonnier, F., Altman, J., and Ahmed, R. (1999). Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* 286, 1377-81.
- Murata, K., Ishii, N., Takano, H., Miura, S., Ndhlovu, L. C., Nose, M., Noda, T., and Sugamura, K. (2000). Impairment of antigen-presenting cell function in mice lacking expression of OX40 ligand. *J Exp Med* 191, 365-74.
- Musiani, P., Maggiano, N., Aiello, F. B., Lauriola, L., Ranelletti, F. O., and Piantelli, M. (1984). Ia- and IgG-Fc receptor-positive accessory cell sustains peripheral T lymphocyte but not thymocyte mitogenesis induced by OKT3 monoclonal antibody. *Cell Immunol* 84, 333-40.
- Naito, Y., Saito, K., Shiiba, K., Ohuchi, A., Saigenji, K., Nagura, H., and Ohtani, H. (1998). CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 58, 3491-4.
- Nakano, O., Sato, M., Naito, Y., Suzuki, K., Orikasa, S., Aizawa, M., Suzuki, Y., Shintaku, I., Nagura, H., and Ohtani, H. (2001). Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res* 61, 5132-6.
- Nalesnik, M. A., Rao, A. S., Furukawa, H., Pham, S., Zeevi, A., Fung, J. J., Klein, G., Gritsch, H. A., Elder, E., Whiteside, T. L., and Starzl, T. E. (1997). Autologous lymphokine-activated killer

- cell therapy of Epstein-Barr virus-positive and -negative lymphoproliferative disorders arising in organ transplant recipients. *Transplantation* 63, 1200-5.
- Nestle, F. O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., and Schadendorf, D.** (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4, 328-32.
- Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., and Honjo, T.** (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11, 141-51.
- Norcross, M. A.** (1984). A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Ann Immunol (Paris)* 135D, 113-34.
- Novak, T. J., Farber, D., Leitenberg, D., Hong, S. C., Johnson, P., and Bottomly, K.** (1994). Isoforms of the transmembrane tyrosine phosphatase CD45 differentially affect T cell recognition. *Immunity* 1, 109-19.
- Ochsenbein, A. F., Klennerman, P., Karrer, U., Ludewig, B., Pericin, M., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M.** (1999). Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2233-8.
- Ochsenbein, A. F., Riddell, S. R., Brown, M., Corey, L., Baerlocher, G. M., Lansdorp, P. M., and Greenberg, P. D.** (2004). CD27 expression promotes long-term survival of functional effector-memory CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in HIV-infected patients. *J Exp Med* 200, 1407-17.
- Oelke, M., Krueger, C., Giuntoli, R. L., 2nd, and Schneck, J. P.** (2005). Artificial antigen-presenting cells: artificial solutions for real diseases. *Trends Mol Med* 11, 412-20.
- Oelke, M., Maus, M. V., Didiano, D., June, C. H., Mackensen, A., and Schneck, J. P.** (2003). Ex vivo induction and expansion of antigen-specific cytotoxic T cells by HLA-Ig-coated artificial antigen-presenting cells. *Nat Med* 9, 619-24.
- Ogg, G. S., Jin, X., Bonhoeffer, S., Dunbar, P. R., Nowak, M. A., Monard, S., Segal, J. P., Cao, Y., Rowland-Jones, S. L., Cerundolo, V., *et al.*** (1998). Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* 279, 2103-6.
- Oh, S., Perera, L. P., Burke, D. S., Waldmann, T. A., and Berzofsky, J. A.** (2004). IL-15/IL-15R α -mediated avidity maturation of memory CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15154-9.
- Ohshima, Y., Tanaka, Y., Tozawa, H., Takahashi, Y., Maliszewski, C., and Delespesse, G.** (1997). Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J Immunol* 159, 3838-48.
- Ohteki, T., Suzue, K., Maki, C., Ota, T., and Koyasu, S.** (2001). Critical role of IL-15-IL-15R for antigen-presenting cell functions in the innate immune response. *Nat Immunol* 2, 1138-43.
- Ohteki, T., Yoshida, H., Matsuyama, T., Duncan, G. S., Mak, T. W., and Ohashi, P. S.** (1998). The transcription factor interferon regulatory factor 1 (IRF-1) is important during the maturation of natural killer 1.1⁺ T cell receptor- α /beta⁺ (NK1⁺ T) cells, natural killer cells, and intestinal intraepithelial T cells. *J Exp Med* 187, 967-72.
- Ostergaard, H. L., Kane, K. P., Mescher, M. F., and Clark, W. R.** (1987). Cytotoxic T lymphocyte mediated lysis without release of serine esterase. *Nature* 330, 71-2.
- Ozaki, K., Spolski, R., Feng, C. G., Qi, C. F., Cheng, J., Sher, A., Morse, H. C., 3rd, Liu, C., Schwartzberg, P. L., and Leonard, W. J.** (2002). A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 298, 1630-4.
- Paczesny, S., Banchereau, J., Wittkowski, K. M., Saracino, G., Fay, J., and Palucka, A. K.** (2004). Expansion of melanoma-specific cytolytic CD8⁺ T cell precursors in patients with metastatic melanoma vaccinated with CD34⁺ progenitor-derived dendritic cells. *J Exp Med* 199, 1503-11.
- Pahl-Seibert, M. F., Juelch, M., Podlech, J., Thomas, D., Deegen, P., Reddehase, M. J., and Holtappels, R.** (2005). Highly protective in vivo function of cytomegalovirus IE1 epitope-specific memory CD8 T cells purified by T-cell receptor-based cell sorting. *J Virol* 79, 5400-13.
- Paiardini, M., Cervasi, B., Albrecht, H., Muthukumar, A., Dunham, R., Gordon, S., Radziejewicz, H., Piedimonte, G., Magnani, M., Montroni, M., *et al.*** (2005). Loss of CD127 expression defines an expansion of effector CD8⁺ T cells in HIV-infected individuals. *J Immunol* 174, 2900-9.
- Palacios, R.** (1985). Mechanisms by which accessory cells contribute in growth of resting T lymphocytes initiated by OKT3 antibody. *Eur J Immunol* 15, 645-51.

- Pan, P. Y., Gu, P., Li, Q., Xu, D., Weber, K., and Chen, S. H.** (2004). Regulation of dendritic cell function by NK cells: mechanisms underlying the synergism in the combination therapy of IL-12 and 4-1BB activation. *J Immunol* 172, 4779-89.
- Pandolfino, M. C., Labarriere, N., Tessier, M. H., Cassidanius, A., Bercegeay, S., Lemarre, P., Dehaut, F., Dreno, B., and Jotereau, F.** (2001). High-scale expansion of melanoma-reactive TIL by a polyclonal stimulus: predictability and relation with disease advancement. *Cancer Immunol Immunother* 50, 134-40.
- Papadopoulos, E. B., Ladanyi, M., Emanuel, D., Mackinnon, S., Boulad, F., Carabasi, M. H., Castro-Malaspina, H., Childs, B. H., Gillio, A. P., Small, T. N., and et al.** (1994). Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 330, 1185-91.
- Papanicolaou, G. A., Latouche, J. B., Tan, C., Dupont, J., Stiles, J., Pamer, E. G., and Sadelain, M.** (2003). Rapid expansion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells expressing a single HLA allele. *Blood* 102, 2498-505.
- Parrish-Novak, J., Dillon, S. R., Nelson, A., Hammond, A., Sprecher, C., Gross, J. A., Johnston, J., Madden, K., Xu, W., West, J., et al.** (2000). Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408, 57-63.
- Pasternack, M. S., Verret, C. R., Liu, M. A., and Eisen, H. N.** (1986). Serine esterase in cytolytic T lymphocytes. *Nature* 322, 740-3.
- Pauly, S., Broll, K., Wittmann, M., Giegerich, G., and Schwarz, H.** (2002). CD137 is expressed by follicular dendritic cells and costimulates B lymphocyte activation in germinal centers. *J Leukoc Biol* 72, 35-42.
- Penn, I.** (1999). Posttransplant malignancies. *Transplant Proc* 31, 1260-2.
- Pihlgren, M., Dubois, P. M., Tomkowiak, M., Sjogren, T., and Marvel, J.** (1996). Resting memory CD8+ T cells are hyperreactive to antigenic challenge in vitro. *J Exp Med* 184, 2141-51.
- Pittet, M. J., Speiser, D. E., Lienard, D., Valmori, D., Guillaume, P., Dutoit, V., Rimoldi, D., Lejeune, F., Cerottini, J. C., and Romero, P.** (2001a). Expansion and functional maturation of human tumor antigen-specific CD8+ T cells after vaccination with antigenic peptide. *Clin Cancer Res* 7, 796s-803s.
- Pittet, M. J., Valmori, D., Dunbar, P. R., Speiser, D. E., Lienard, D., Lejeune, F., Fleischhauer, K., Cerundolo, V., Cerottini, J. C., and Romero, P.** (1999). High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. *J Exp Med* 190, 705-15.
- Pittet, M. J., Zippelius, A., Speiser, D. E., Assenmacher, M., Guillaume, P., Valmori, D., Lienard, D., Lejeune, F., Cerottini, J. C., and Romero, P.** (2001b). Ex vivo IFN-gamma secretion by circulating CD8 T lymphocytes: implications of a novel approach for T cell monitoring in infectious and malignant diseases. *J Immunol* 166, 7634-40.
- Plas, D. R., Rathmell, J. C., and Thompson, C. B.** (2002). Homeostatic control of lymphocyte survival: potential origins and implications. *Nat Immunol* 3, 515-21.
- Podack, E. R., Young, J. D., and Cohn, Z. A.** (1985). Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 8629-33.
- Pollok, K. E., Kim, S. H., and Kwon, B. S.** (1995). Regulation of 4-1BB expression by cell-cell interactions and the cytokines, interleukin-2 and interleukin-4. *Eur J Immunol* 25, 488-94.
- Pollok, K. E., Kim, Y. J., Hurtado, J., Zhou, Z., Kim, K. K., and Kwon, B. S.** (1994). 4-1BB T-cell antigen binds to mature B cells and macrophages, and costimulates anti-mu-primed splenic B cells. *Eur J Immunol* 24, 367-74.
- Pollok, K. E., Kim, Y. J., Zhou, Z., Hurtado, J., Kim, K. K., Pickard, R. T., and Kwon, B. S.** (1993). Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *J Immunol* 150, 771-81.
- Poppema, S., Potters, M., Visser, L., and van den Berg, A. M.** (1998). Immune escape mechanisms in Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 9 Suppl 5, S21-4.
- Powell, D. J., Jr., Dudley, M. E., Robbins, P. F., and Rosenberg, S. A.** (2005). Transition of late-stage effector T cells to CD27+ CD28+ tumor-reactive effector memory T cells in humans after adoptive cell transfer therapy. *Blood* 105, 241-50.

- Prakken, B., Wauben, M., Genini, D., Samodal, R., Barnett, J., Mendivil, A., Leoni, L., and Albani, S.** (2000). Artificial antigen-presenting cells as a tool to exploit the immune 'synapse'. *Nat Med* 6, 1406-10.
- Quinnan, G. V., Jr., Kirmani, N., Rook, A. H., Manischewitz, J. F., Jackson, L., Moreschi, G., Santos, G. W., Saral, R., and Burns, W. H.** (1982). Cytotoxic t cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med* 307, 7-13.
- Radvanyi, L. G., Mills, G. B., and Miller, R. G.** (1993). Religation of the T cell receptor after primary activation of mature T cells inhibits proliferation and induces apoptotic cell death. *J Immunol* 150, 5704-15.
- Rammensee, H. G., Friede, T., and Stevanović, S.** (1995). MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41, 178-228.
- Ravkov, E. V., Myrick, C. M., and Altman, J. D.** (2003). Immediate early effector functions of virus-specific CD8+CCR7+ memory cells in humans defined by HLA and CC chemokine ligand 19 tetramers. *J Immunol* 170, 2461-8.
- Refaeli, Y., Van Parijs, L., London, C. A., Tschopp, J., and Abbas, A. K.** (1998). Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* 8, 615-23.
- Riddell, S. R., Watanabe, K. S., Goodrich, J. M., Li, C. R., Agha, M. E., and Greenberg, P. D.** (1992). Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 257, 238-41.
- Romagnani, S., Del Prete, G., Maggi, E., Chilosi, M., Caligaris-Cappio, F., and Pizzolo, G.** (1995). CD30 and type 2 T helper (Th2) responses. *J Leukoc Biol* 57, 726-30.
- Rooney, C. M., Smith, C. A., Ng, C. Y., Loftin, S., Li, C., Krance, R. A., Brenner, M. K., and Heslop, H. E.** (1995). Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* 345, 9-13.
- Rooney, C. M., Smith, C. A., Ng, C. Y., Loftin, S. K., Sixbey, J. W., Gan, Y., Srivastava, D. K., Bowman, L. C., Krance, R. A., Brenner, M. K., and Heslop, H. E.** (1998). Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 92, 1549-55.
- Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Chang, A. E., Avis, F. P., Leitman, S., Linehan, W. M., Robertson, C. N., Lee, R. E., Rubin, J. T., and et al.** (1987). A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 316, 889-97.
- Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Yang, J. C., Topalian, S. L., Chang, A. E., Schwartzentruber, D. J., Aebersold, P., Leitman, S., Linehan, W. M., Seipp, C. A., and et al.** (1993). Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst* 85, 622-32.
- Rosenberg, S. A., Spiess, P., and Lafreniere, R.** (1986). A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 233, 1318-21.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Topalian, S. L., Restifo, N. P., Dudley, M. E., Schwarz, S. L., Spiess, P. J., et al.** (1998). Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 4, 321-7.
- Rosenberg, S. A., Yannelli, J. R., Yang, J. C., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Weber, J. S., Parkinson, D. R., Seipp, C. A., Einhorn, J. H., and White, D. E.** (1994). Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst* 86, 1159-66.
- Rouvier, E., Luciani, M. F., and Golstein, P.** (1993). Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 177, 195-200.
- Roychowdhury, S., May, K. F., Jr., Tzou, K. S., Lin, T., Bhatt, D., Freud, A. G., Guimond, M., Ferketich, A. K., Liu, Y., and Caligiuri, M. A.** (2004). Failed adoptive immunotherapy with tumor-specific T cells: reversal with low-dose interleukin 15 but not low-dose interleukin 2. *Cancer Res* 64, 8062-7.
- Rubio, V., Stuge, T. B., Singh, N., Betts, M. R., Weber, J. S., Roederer, M., and Lee, P. P.** (2003). Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells. *Nat Med* 9, 1377-82.

- Salih, H. R., Kosowski, S. G., Haluska, V. F., Starling, G. C., Loo, D. T., Lee, F., Aruffo, A. A., Trail, P. A., and Kiener, P. A.** (2000). Constitutive expression of functional 4-1BB (CD137) ligand on carcinoma cells. *J Immunol* 165, 2903-10.
- Salih, H. R., Schmetzer, H. M., Burke, C., Starling, G. C., Dunn, R., Pelka-Fleischer, R., Nuessler, V., and Kiener, P. A.** (2001). Soluble CD137 (4-1BB) ligand is released following leukocyte activation and is found in sera of patients with hematological malignancies. *J Immunol* 167, 4059-66.
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A.** (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-12.
- Salter, R. D., Benjamin, R. J., Wesley, P. K., Buxton, S. E., Garrett, T. P., Clayberger, C., Krensky, A. M., Norment, A. M., Littman, D. R., and Parham, P.** (1990). A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha 3 domain of HLA-A2. *Nature* 345, 41-6.
- Sandberg, J. K., Fast, N. M., and Nixon, D. F.** (2001). Functional heterogeneity of cytokines and cytolytic effector molecules in human CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 167, 181-7.
- Saoulli, K., Lee, S. Y., Cannons, J. L., Yeh, W. C., Santana, A., Goldstein, M. D., Bangia, N., DeBenedette, M. A., Mak, T. W., Choi, Y., and Watts, T. H.** (1998). CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand. *J Exp Med* 187, 1849-62.
- Sauce, D., Bodinier, M., Garin, M., Petracca, B., Tonnelier, N., Duperrier, A., Melo, J. V., Apperley, J. F., Ferrand, C., Herve, P., et al.** (2002). Retrovirus-mediated gene transfer in primary T lymphocytes impairs their anti-Epstein-Barr virus potential through both culture-dependent and selection process-dependent mechanisms. *Blood* 99, 1165-73.
- Sauce, D., Rufer, N., Mercier, P., Bodinier, M., Remy-Martin, J. P., Duperrier, A., Ferrand, C., Herve, P., Romero, P., Lang, F., et al.** (2003). Retrovirus-mediated gene transfer in polyclonal T cells results in lower apoptosis and enhanced ex vivo cell expansion of CMV-reactive CD8 T cells as compared with EBV-reactive CD8 T cells. *Blood* 102, 1241-8.
- Savage, C. O., Hughes, C. C., McIntyre, B. W., Picard, J. K., and Poher, J. S.** (1993). Human CD4+ T cells proliferate to HLA-DR+ allogeneic vascular endothelium. Identification of accessory interactions. *Transplantation* 56, 128-34.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E.** (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17, 1675-87.
- Schaar, C. G., van der Pijl, J. W., van Hoek, B., de Fijter, J. W., Veenendaal, R. A., Kluin, P. M., van Krieken, J. H., Hekman, A., Terpstra, W. E., Willemze, R., and Kluin-Nelemans, H. C.** (2001). Successful outcome with a "quintuple approach" of posttransplant lymphoproliferative disorder. *Transplantation* 71, 47-52.
- Schadendorf, D., Paschen, A., and Sun, Y.** (2000). Autologous, allogeneic tumor cells or genetically engineered cells as cancer vaccine against melanoma. *Immunol Lett* 74, 67-74.
- Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C., and Lefrancois, L.** (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1, 426-32.
- Schluns, K. S., and Lefrancois, L.** (2003). Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol* 3, 269-79.
- Schluter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Becker, M. H., Key, G., Flad, H. D., and Gerdes, J.** (1993). The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 123, 513-22.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R., and Melief, C. J.** (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393, 480-3.
- Schonland, S. O., Zimmer, J. K., Lopez-Benitez, C. M., Widmann, T., Ramin, K. D., Goronzy, J. J., and Weyand, C. M.** (2003). Homeostatic control of T-cell generation in neonates. *Blood* 102, 1428-34.
- Schorle, H., Holtschke, T., Hunig, T., Schimpl, A., and Horak, I.** (1991). Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* 352, 621-4.
- Schwarz, H., Blanco, F. J., von Kempis, J., Valbracht, J., and Lotz, M.** (1996). ILA, a member of the human nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family, regulates T-lymphocyte proliferation and survival. *Blood* 87, 2839-45.

- Schwarz, H., Tuckwell, J., and Lotz, M.** (1993). A receptor induced by lymphocyte activation (ILA): a new member of the human nerve-growth-factor/tumor-necrosis-factor receptor family. *Gene* 134, 295-8.
- Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M. F., and Ohashi, P. S.** (1999). Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 17, 829-74.
- Seo, S. K., Choi, J. H., Kim, Y. H., Kang, W. J., Park, H. Y., Suh, J. H., Choi, B. K., Vinay, D. S., and Kwon, B. S.** (2004). 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nat Med* 10, 1088-94.
- Shapiro, R. S., McClain, K., Frizzera, G., Gajl-Peczalska, K. J., Kersey, J. H., Blazar, B. R., Arthur, D. C., Patton, D. F., Greenberg, J. S., Burke, B., and et al.** (1988). Epstein-Barr virus associated B cell lymphoproliferative disorders following bone marrow transplantation. *Blood* 71, 1234-43.
- Sheu, B. C., Lin, R. H., Lien, H. C., Ho, H. N., Hsu, S. M., and Huang, S. C.** (2001). Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J Immunol* 167, 2972-8.
- Shi, L., Kraut, R. P., Aebersold, R., and Greenberg, A. H.** (1992). A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. *J Exp Med* 175, 553-66.
- Shin, T., Yoshimura, K., Crafton, E. B., Tsuchiya, H., Housseau, F., Koseki, H., Schulick, R. D., Chen, L., and Pardoll, D. M.** (2005). In vivo costimulatory role of B7-DC in tuning T helper cell 1 and cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 201, 1531-41.
- Shuford, W. W., Klussman, K., Trichtler, D. D., Loo, D. T., Chalupny, J., Siadak, A. W., Brown, T. J., Emswiler, J., Raecho, H., Larsen, C. P., et al.** (1997). 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J Exp Med* 186, 47-55.
- Simons, K., and Ikonen, E.** (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-72.
- Smith, K. A.** (1988). Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 240, 1169-76.
- Speiser, D. E., Lienard, D., Pittet, M. J., Batard, P., Rimoldi, D., Guillaume, P., Cerottini, J. C., and Romero, P.** (2002). In vivo activation of melanoma-specific CD8(+) T cells by endogenous tumor antigen and peptide vaccines. A comparison to virus-specific T cells. *Eur J Immunol* 32, 731-41.
- Speiser, D. E., Sebzda, E., Ohteki, T., Bachmann, M. F., Pfeffer, K., Mak, T. W., and Ohashi, P. S.** (1996). Tumor necrosis factor receptor p55 mediates deletion of peripheral cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Eur J Immunol* 26, 3055-60.
- Sprent, J., and Surh, C. D.** (2002). T cell memory. *Annu Rev Immunol* 20, 551-79.
- Springer, T. A., and Lasky, L. A.** (1991). Cell adhesion. Sticky sugars for selectins. *Nature* 349, 196-7.
- Staratschek-Jox, A., Kotkowski, S., Belge, G., Rudiger, T., Bullerdiek, J., Diehl, V., and Wolf, J.** (2000). Detection of Epstein-Barr virus in Hodgkin-Reed-Sternberg cells : no evidence for the persistence of integrated viral fragments in Latent membrane protein-1 (LMP-1)-negative classical Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 156, 209-16.
- Starck, L., Scholz, C., Dorken, B., and Daniel, P. T.** (2005). Costimulation by CD137/4-1BB inhibits T cell apoptosis and induces Bcl-x(L) and c-FLIP(short) via phosphatidylinositol 3-kinase and AKT/protein kinase B. *Eur J Immunol*.
- Staveley-O'Carroll, K., Sotomayor, E., Montgomery, J., Borrello, I., Hwang, L., Fein, S., Pardoll, D., and Levitsky, H.** (1998). Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1178-83.
- Stephens, G. L., McHugh, R. S., Whitters, M. J., Young, D. A., Luxenberg, D., Carreno, B. M., Collins, M., and Shevach, E. M.** (2004). Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 173, 5008-20.
- Strengell, M., Matikainen, S., Siren, J., Lehtonen, A., Foster, D., Julkunen, I., and Sareneva, T.** (2003). IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-gamma production in human NK and T cells. *J Immunol* 170, 5464-9.
- Streuli, M., Hall, L. R., Saga, Y., Schlossman, S. F., and Saito, H.** (1987). Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human leukocyte common antigens. *J Exp Med* 166, 1548-66.

- Suda, T., Okazaki, T., Naito, Y., Yokota, T., Arai, N., Ozaki, S., Nakao, K., and Nagata, S.** (1995). Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol* 154, 3806-13.
- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., and Nagata, S.** (1993). Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169-78.
- Sun, S., Cai, Z., Langlade-Demoyen, P., Kosaka, H., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A., and Sprent, J.** (1996). Dual function of Drosophila cells as APCs for naive CD8⁺ T cells: implications for tumor immunotherapy. *Immunity* 4, 555-64.
- Sun, Y., Chen, H. M., Subudhi, S. K., Chen, J., Koka, R., Chen, L., and Fu, Y. X.** (2002a). Costimulatory molecule-targeted antibody therapy of a spontaneous autoimmune disease. *Nat Med* 8, 1405-13.
- Sun, Y., Lin, X., Chen, H. M., Wu, Q., Subudhi, S. K., Chen, L., and Fu, Y. X.** (2002b). Administration of agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 168, 1457-65.
- Takahashi, C., Mittler, R. S., and Vella, A. T.** (1999). Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal. *J Immunol* 162, 5037-40.
- Tamada, K., Shimozaaki, K., Chapoval, A. I., Zhu, G., Sica, G., Flies, D., Boone, T., Hsu, H., Fu, Y. X., Nagata, S., et al.** (2000). Modulation of T-cell-mediated immunity in tumor and graft-versus-host disease models through the LIGHT co-stimulatory pathway. *Nat Med* 6, 283-9.
- Tan, J. T., Dudl, E., LeRoy, E., Murray, R., Sprent, J., Weinberg, K. I., and Surh, C. D.** (2001). IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8732-7.
- Tan, L. C., Gudgeon, N., Annels, N. E., Hansasuta, P., O'Callaghan, C. A., Rowland-Jones, S., McMichael, A. J., Rickinson, A. B., and Callan, M. F.** (1999a). A re-evaluation of the frequency of CD8⁺ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *J Immunol* 162, 1827-35.
- Tan, R., Xu, X., Ogg, G. S., Hansasuta, P., Dong, T., Rostron, T., Luzzi, G., Conlon, C. P., Screaton, G. R., McMichael, A. J., and Rowland-Jones, S.** (1999b). Rapid death of adoptively transferred T cells in acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* 93, 1506-10.
- Tanchot, C., Lemonnier, F. A., Perarnau, B., Freitas, A. A., and Rocha, B.** (1997). Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 276, 2057-62.
- Taraban, V. Y., Rowley, T. F., O'Brien, L., Chan, H. T., Haswell, L. E., Green, M. H., Tutt, A. L., Glennie, M. J., and Al-Shamkhani, A.** (2002). Expression and costimulatory effects of the TNF receptor superfamily members CD134 (OX40) and CD137 (4-1BB), and their role in the generation of anti-tumor immune responses. *Eur J Immunol* 32, 3617-27.
- Tarkowski, M.** (2003). Expression and a role of CD30 in regulation of T-cell activity. *Curr Opin Hematol* 10, 267-71.
- Tesselaar, K., Arens, R., van Schijndel, G. M., Baars, P. A., van der Valk, M. A., Borst, J., van Oers, M. H., and van Lier, R. A.** (2003). Lethal T cell immunodeficiency induced by chronic costimulation via CD27-CD70 interactions. *Nat Immunol* 4, 49-54.
- Tham, E. L., Jensen, P. L., and Mescher, M. F.** (2001). Activation of antigen-specific T cells by artificial cell constructs having immobilized multimeric peptide-class I complexes and recombinant B7-Fc proteins. *J Immunol Methods* 249, 111-9.
- Thomas, J. A., Allday, M. J., and Crawford, D. H.** (1991). Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders in immunocompromised individuals. *Adv Cancer Res* 57, 329-80.
- Thompson, C. B., Lindsten, T., Ledbetter, J. A., Kunkel, S. L., Young, H. A., Emerson, S. G., Leiden, J. M., and June, C. H.** (1989). CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1333-7.
- Tiberghien, P., Ferrand, C., Lioure, B., Milpied, N., Angonin, R., Deconinck, E., Certoux, J. M., Robinet, E., Saas, P., Petracca, B., et al.** (2001). Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft. *Blood* 97, 63-72.
- Tone, M., Tone, Y., Adams, E., Yates, S. F., Frewin, M. R., Cobbold, S. P., and Waldmann, H.** (2003). Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15059-64.
- Topp, M. S., Riddell, S. R., Akatsuka, Y., Jensen, M. C., Blattman, J. N., and Greenberg, P. D.** (2003). Restoration of CD28 expression in CD28⁻ CD8⁺ memory effector T cells reconstitutes antigen-induced IL-2 production. *J Exp Med* 198, 947-55.

- Townsend, A. R., Rothbard, J., Gotch, F. M., Bahadur, G., Wraith, D., and McMichael, A. J.** (1986). The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell* 44, 959-68.
- Trabzuni, D., Famulski, K. S., and Ahmad, M.** (2000). Functional analysis of tumour necrosis factor- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): cysteine-230 plays a critical role in the homotrimerization and biological activity of this novel tumoricidal cytokine. *Biochem J* 350 Pt 2, 505-10.
- Trowbridge, I. S., and Thomas, M. L.** (1994). CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 12, 85-116.
- Tseng, S. Y., Otsuji, M., Gorski, K., Huang, X., Slansky, J. E., Pai, S. I., Shalabi, A., Shin, T., Pardoll, D. M., and Tsuchiya, H.** (2001). B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* 193, 839-46.
- Tskvitaria-Fuller, I., Rozelle, A. L., Yin, H. L., and Wulfig, C.** (2003). Regulation of sustained actin dynamics by the TCR and costimulation as a mechanism of receptor localization. *J Immunol* 171, 2287-95.
- Turner, J. M., Brodsky, M. H., Irving, B. A., Levin, S. D., Perlmutter, R. M., and Littman, D. R.** (1990). Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell* 60, 755-65.
- Unsoeld, H., Krautwald, S., Voehringer, D., Kunzendorf, U., and Pircher, H.** (2002). Cutting edge: CCR7+ and CCR7- memory T cells do not differ in immediate effector cell function. *J Immunol* 169, 638-41.
- Urbani, S., Boni, C., Missale, G., Elia, G., Cavallo, C., Massari, M., Raimondo, G., and Ferrari, C.** (2002). Virus-specific CD8+ lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. *J Virol* 76, 12423-34.
- Valmori, D., Dutoit, V., Lienard, D., Rimoldi, D., Pittet, M. J., Champagne, P., Ellefsen, K., Sahin, U., Speiser, D., Lejeune, F., *et al.*** (2000). Naturally occurring human lymphocyte antigen-A2 restricted CD8+ T-cell response to the cancer testis antigen NY-ESO-1 in melanoma patients. *Cancer Res* 60, 4499-506.
- Valmori, D., Scheibenbogen, C., Dutoit, V., Nagorsen, D., Asemissen, A. M., Rubio-Godoy, V., Rimoldi, D., Guillaume, P., Romero, P., Schadendorf, D., *et al.*** (2002). Circulating Tumor-reactive CD8(+) T cells in melanoma patients contain a CD45RA(+)CCR7(-) effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity. *Cancer Res* 62, 1743-50.
- van den Broek, M. E., Kagi, D., Ossendorp, F., Toes, R., Vamvakas, S., Lutz, W. K., Melief, C. J., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H.** (1996). Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med* 184, 1781-90.
- van Kooyk, Y., van de Wiel-van Kemenade, P., Weder, P., Kuijpers, T. W., and Figdor, C. G.** (1989). Enhancement of LFA-1-mediated cell adhesion by triggering through CD2 or CD3 on T lymphocytes. *Nature* 342, 811-3.
- van Leeuwen, E. M., de Bree, G. J., Remmerswaal, E. B., Yong, S. L., Tesselaar, K., ten Berge, I. J., and van Lier, R. A.** (2005). IL-7 receptor α chain expression distinguishes functional subsets of virus-specific human CD8+ T cells. *Blood* 106, 2091-8.
- van Leeuwen, E. M., Gamadia, L. E., Baars, P. A., Remmerswaal, E. B., ten Berge, I. J., and van Lier, R. A.** (2002). Proliferation requirements of cytomegalovirus-specific, effector-type human CD8+ T cells. *J Immunol* 169, 5838-43.
- van Lier, R. A., ten Berge, I. J., and Gamadia, L. E.** (2003). Human CD8(+) T-cell differentiation in response to viruses. *Nat Rev Immunol* 3, 931-9.
- Van Parijs, L., Refaelli, Y., Lord, J. D., Nelson, B. H., Abbas, A. K., and Baltimore, D.** (1999). Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. *Immunity* 11, 281-8.
- van Stipdonk, M. J., Lemmens, E. E., and Schoenberger, S. P.** (2001). Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat Immunol* 2, 423-9.
- Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M., and Bolen, J. B.** (1988). The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* 55, 301-8.

- Vignard, V., Lemerrier, B., Lim, A., Pandolfino, M. C., Guilloux, Y., Khammari, A., Rabu, C., Echasserieu, K., Lang, F., Gougeon, M. L., et al.** (2005). Adoptive Transfer of Tumor-Reactive Melan-A-Specific CTL Clones in Melanoma Patients Is Followed by Increased Frequencies of Additional Melan-A-Specific T Cells. *J Immunol* 175, 4797-805.
- Villinger, F., Miller, R., Mori, K., Mayne, A. E., Bostik, P., Sundstrom, J. B., Sugimoto, C., and Ansari, A. A.** (2004). IL-15 is superior to IL-2 in the generation of long-lived antigen specific memory CD4 and CD8 T cells in rhesus macaques. *Vaccine* 22, 3510-21.
- Vinay, D. S., and Kwon, B. S.** (1998). Role of 4-1BB in immune responses. *Semin Immunol* 10, 481-9.
- Vivier, E., and Daeron, M.** (1997). Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol Today* 18, 286-91.
- von Andrian, U. H., and Mackay, C. R.** (2000). T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 343, 1020-34.
- von Freeden-Jeffry, U., Solvason, N., Howard, M., and Murray, R.** (1997). The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* 7, 147-54.
- Walter, E. A., Greenberg, P. D., Gilbert, M. J., Finch, R. J., Watanabe, K. S., Thomas, E. D., and Riddell, S. R.** (1995). Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 333, 1038-44.
- Walunas, T. L., Bakker, C. Y., and Bluestone, J. A.** (1996). CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med* 183, 2541-50.
- Wang, R. F., and Rosenberg, S. A.** (1999). Human tumor antigens for cancer vaccine development. *Immunol Rev* 170, 85-100.
- Ward, S. G., Ley, S. C., MacPhee, C., and Cantrell, D. A.** (1992). Regulation of D-3 phosphoinositides during T cell activation via the T cell antigen receptor/CD3 complex and CD2 antigens. *Eur J Immunol* 22, 45-9.
- Watanabe, M., Hara, Y., Tanabe, K., Toma, H., and Abe, R.** (2005). A distinct role for ICOS-mediated co-stimulatory signaling in CD4+ and CD8+ T cell subsets. *Int Immunol* 17, 269-78.
- Watson, A. R., and Lee, W. T.** (2004). Differences in signaling molecule organization between naive and memory CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 173, 33-41.
- Watts, T. H.** (2005). TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol* 23, 23-68.
- Weinberg, A. D., Vella, A. T., and Croft, M.** (1998). OX-40: life beyond the effector T cell stage. *Semin Immunol* 10, 471-80.
- Wen, T., Bukeczynski, J., and Watts, T. H.** (2002). 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function. *J Immunol* 168, 4897-906.
- Weng, N. P., Levine, B. L., June, C. H., and Hodes, R. J.** (1996). Regulated expression of telomerase activity in human T lymphocyte development and activation. *J Exp Med* 183, 2471-9.
- Wesselborg, S., Janssen, O., and Kabelitz, D.** (1993). Induction of activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells. *J Immunol* 150, 4338-45.
- Wherry, E. J., Barber, D. L., Kaech, S. M., Blattman, J. N., and Ahmed, R.** (2004). Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16004-9.
- Wherry, E. J., Teichgraber, V., Becker, T. C., Masopust, D., Kaech, S. M., Antia, R., von Andrian, U. H., and Ahmed, R.** (2003). Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* 4, 225-34.
- Wilcox, R. A., Tamada, K., Strome, S. E., and Chen, L.** (2002). Signaling through NK cell-associated CD137 promotes both helper function for CD8+ cytolytic T cells and responsiveness to IL-2 but not cytolytic activity. *J Immunol* 169, 4230-6.
- Willerford, D. M., Chen, J., Ferry, J. A., Davidson, L., Ma, A., and Alt, F. W.** (1995). Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 3, 521-30.
- Wills, M. R., Okecha, G., Weekes, M. P., Gandhi, M. K., Sissons, P. J., and Carmichael, A. J.** (2002). Identification of naive or antigen-experienced human CD8(+) T cells by expression of

- costimulation and chemokine receptors: analysis of the human cytomegalovirus-specific CD8(+) T cell response. *J Immunol* 168, 5455-64.
- Wittig, B., Marten, A., Dorbic, T., Weineck, S., Min, H., Niemitz, S., Trojanek, B., Flieger, D., Kruopis, S., Albers, A., et al.** (2001). Therapeutic vaccination against metastatic carcinoma by expression-modulated and immunomodified autologous tumor cells: a first clinical phase I/II trial. *Hum Gene Ther* 12, 267-78.
- Woo, E. Y., Chu, C. S., Goletz, T. J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., Rubin, S. C., Kaiser, L. R., and June, C. H.** (2001). Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 61, 4766-72.
- Wyer, J. R., Willcox, B. E., Gao, G. F., Gerth, U. C., Davis, S. J., Bell, J. I., van der Merwe, P. A., and Jakobsen, B. K.** (1999). T cell receptor and coreceptor CD8 alphaalpha bind peptide-MHC independently and with distinct kinetics. *Immunity* 10, 219-25.
- Xue, H. H., Kovanen, P. E., Pise-Masison, C. A., Berg, M., Radovich, M. F., Brady, J. N., and Leonard, W. J.** (2002). IL-2 negatively regulates IL-7 receptor alpha chain expression in activated T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13759-64.
- Yamshchikov, G., Thompson, L., Ross, W. G., Galavotti, H., Aquila, W., Deacon, D., Caldwell, J., Patterson, J. W., Hunt, D. F., and Slingluff, C. L., Jr.** (2001). Analysis of a natural immune response against tumor antigens in a melanoma survivor: lessons applicable to clinical trial evaluations. *Clin Cancer Res* 7, 909s-16s.
- Yee, C., Thompson, J. A., Byrd, D., Riddell, S. R., Roche, P., Celis, E., and Greenberg, P. D.** (2002). Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16168-73.
- Zeng, R., Spolski, R., Finkelstein, S. E., Oh, S., Kovanen, P. E., Hinrichs, C. S., Pise-Masison, C. A., Radonovich, M. F., Brady, J. N., Restifo, N. P., et al.** (2005). Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *J Exp Med* 201, 139-48.
- Zhang, L., Conejo-Garcia, J. R., Katsaros, D., Gimotty, P. A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M. N., et al.** (2003). Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348, 203-13.
- Zhang, W., Tribble, R. P., and Samelson, L. E.** (1998). LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* 9, 239-46.
- Zheng, G., Wang, B., and Chen, A.** (2004). The 4-1BB costimulation augments the proliferation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 173, 2428-34.
- Zheng, L., Fisher, G., Miller, R. E., Peschon, J., Lynch, D. H., and Lenardo, M. J.** (1995). Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377, 348-51.
- Zimmermann, C., Prevost-Blondel, A., Blaser, C., and Pircher, H.** (1999). Kinetics of the response of naive and memory CD8 T cells to antigen: similarities and differences. *Eur J Immunol* 29, 284-90.
- Zinkernagel, R. M., and Doherty, P. C.** (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248, 701-2.

Amplification *ex vivo* de lymphocytes T CD8 humains spécifiques à l'aide de molécules recombinantes multimérisées.

L'immunothérapie cellulaire passive par injection de lymphocytes T cytotoxiques offre des possibilités thérapeutiques nouvelles dans l'immunité anti-virale et anti-tumorale. Par rapport aux méthodes actuelles de stimulation utilisant des lignées présentatrices d'antigènes, nous essayons de développer une méthode alternative d'amplification des lymphocytes T CD8 à l'aide d'une combinaison de protéines recombinantes immobilisées sur billes.

L'interaction 4-1BB/4-1BBL (CD137/CD137L) constitue un des signaux de co-stimulation impliqués dans l'activation des lymphocytes T CD8 effecteurs. Le travail présenté ici décrit pour la première fois la production et la caractérisation d'une forme fonctionnelle de 4-1BBL recombinant soluble. De plus, nous montrons qu'il est possible d'amplifier *in vitro* des lymphocytes T mémoires anti-CMV et anti-EBV avec des complexes HLA-peptide associés à ce 4-1BBL ou à de l'anticorps anti-CD28. L'intérêt de la co-stimulation du 4-1BB est comparée à celle du CD28 dans les 2 contextes antigéniques étudiés.

Mots clés: lymphocyte T CD8, 4-1BB Ligand, immunothérapie passive, CMV, EBV

***Ex vivo* amplification of human specific CD8 T lymphocytes with immobilized recombinant proteins.**

Adoptive cellular immunotherapy based on T lymphocytes infusion holds promise to restore immunity in viral and tumoral pathologies. The methods developed so far are using antigen presenting cell lines to stimulate T lymphocytes. We are developing an alternate CD8 T lymphocyte amplification method using a mix of bead immobilized recombinant proteins.

4-1BB/4-1BBL (CD137/CD137L) interaction is one of the co-stimulatory pathway leading to effector CD8 T lymphocyte activation. The present work describes for the first time the production and the characterisation of a functional soluble recombinant 4-1BBL. Moreover, we show that it is possible to amplify memory anti-CMV and anti-EBV T lymphocytes *in vitro* using HLA-peptide complexes associated with either our 4-1BBL or antibody to CD28. The benefit of 4-1BB co-stimulation compared to that of anti-CD28 is evaluated in both studied antigenic situations.

Key Words: CD8 T lymphocytes, 4-1BBL, adoptive immunotherapy, CMV, EBV